

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) K 2767 Wd

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
Spermatogenese-Protein

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SEDLACEK, Zdenek
Burgstr. 52
69121 Heidelberg

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Cz

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Andrea Schüßler

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

POUSTKA, Annemarie
Werderstr. 36
60120 Heidelberg

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben).

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GN Guinea | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> Indien |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> Grenada |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		ationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 10. Dez. 1998	198 56 882.7	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):
ISA / EPA	Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

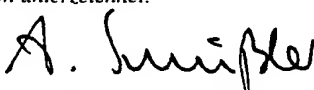
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 4	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 11	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 2	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 9	5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 11	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 38	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
	8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auführen):
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:
	folgt

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 8.12.1999


Dr. Andrea Schüßler (Patentanwältin)

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34472 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03972 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Dezember 1999 (08.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 56 882.7 10. Dezember 1998 (10.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEDLACEK, Zdenek [CZ/DE]; Burgstrasse 52, D-69121 Heidelberg (DE). POUSTKA, Annemarie [AT/DE]; Werderstrasse 36, D-60120 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: SPERMATOGENESIS PROTEIN (54) Bezeichnung: SPERMATOGENESE-PROTEIN (57) Abstract <p>The invention relates to a spermatogenesis protein as well as to DNA coding for and a method for producing such a protein. The invention further relates to antibodies to said protein and to the use of the DNA and the protein for studying or influencing spermatogenesis.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.</p>		

Unser Zeichen: K 2767 - hu / wd

Spermatogenese-Protein

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.

Mit Spermatogenese wird die Bildung von Spermien in Säugetieren bzw. dem Menschen bezeichnet. Diese Bildung erfolgt in den Hoden. Während der Spermatogenese, insbesondere dem Pachytän-Stadium der Meiose, lagern sich die X- und Y-Chromosomen aneinander und bilden einen sog. Sexkörper aus. In diesem liegen die X- und Y-Chromosomen inaktiv vor, d.h. sie werden nicht transkribiert.

Es hat sich nun gezeigt, daß von einigen Genen der X- und Y-Chromosomen Partner-Gene existieren, die autosomal lokalisiert sind. Diese werden u.a. in den Hoden exprimiert, wodurch ihre Genprodukte in der Spermatogenese kompensatorische Funktionen hinsichtlich der entsprechenden inaktivierten Gene der X- und Y-Chromosomen haben.

Ein Eingreifen in die Spermatogenese ist nachwievor ein großes Problem. Dies liegt insbesondere daran, daß die Spermatogenese nicht im Detail verstanden ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Spermatogenese untersucht und ggfs. Wege aufgezeigt werden können, mit denen in die Spermatogenese eingegriffen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß das X-chromosomal lokalisierte Gen XAP-5 ein Partner-Gen aufweist, das autosomal lokalisiert ist und in vielen Geweben exprimiert wird. Beispielsweise ist die Expression in den Hoden zu finden, wobei sie hier besonders stark ist in der Spermatogenese, insbesondere in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Das Partner-Gen wird mit X5L bezeichnet und ist im humanen Genom auf Chromosom 6 in der Region 6pter lokalisiert. Der Anmelder hat X5L auf dem PAC-Klon LLNLp 704K12294Q13 isoliert und charakterisiert. Die DNA umfaßt eine kodierende Sequenz und ein Intron und führt zu einer etwa 1.6 kb großen cDNA. Diese kodiert für ein etwa 37 kD großes, 325 Aminosäuren umfassendes mit X5L-Protein bezeichnetes Spermatogenese-Protein (vgl. Figuren 1, 2 und 5,6). Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Mutationen im X5L-Protein die Spermatogenese beeinträchtigen können.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Spermatogenese-Protein (X5L-Protein) bereitzustellen, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und der Aminosäuresequenz von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende Aminosäuresequenz, die zu jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Die Aminosäuresequenz kann sich von jener von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Aminosäuren unterscheiden. Insbesondere kann die Aminosäuresequenz jene von Fig. 3 sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein X5L-Protein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA, z.B. eine cDNA,

sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Basenpaare unterscheiden. Insbesondere kann die DNA-Sequenz jene der Figuren 2-4 sein. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA-Sequenz hin.

Die DNAs der Figuren 1-4 wurden als h-X5L-c, h-X5L-g, m-X5L-c bzw. m-X5L-g bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 12550, DSM 12553, DSM 12552 bzw. DSM 12551 am 26. Nov. 1998 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein X5L-Protein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Ex-

pression in Insektenzellen eignet sich besonders der Bacculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so
15 daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

20 Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und
30 Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der
35 Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein

Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- 5 (b) ein erfindungsgemäßes Spermatogenese-Protein (X5L-Protein)
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

10 Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

15 Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Spermatogenese zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein X5L-Protein nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung zwischen einem X5L-Protein und Vorgängen in der Spermatogenese
20 hergestellt werden. Ferner kann mit einem X5L-Protein ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen.
25 Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Organisation und die Expression des für ein X5L-Protein kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, über in
30 situ Hybridisierung oder durch PCR, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen zur Inhibition oder Aktivitätssteigerung eines X5L-Proteins in
35 Personen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein X5L-Protein inhibiert werden. Andererseits kann mit einem X5L-Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge eines X5L-Proteins in Personen erhöht

werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines konstitutiven bzw. in bestimmten Geweben, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines X5L-Proteins in den Personen bzw. in bestimmten Geweben, z.B. Hoden, dieser führt.

Somit stellt die vorliegende Erfindung Mittel dar, die Spermatogenese zu untersuchen und in sie regulierend einzugreifen. Letzteres umfaßt sowohl ihre Aktivierung als auch ihre Inhibierung. Insbesondere liefert die vorliegende Erfindung Mittel, Störungen der Spermatogenese zu diagnostizieren und zu behandeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines erfindungsgemäßen, 325 Aminosäuren umfassenden Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein). Die DNA-Sequenz ist eine humane cDNA.

Fig. 2 zeigt die Sequenzen einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem humanen Genom. Die cDNA von Fig. 1 beginnt am Basenpaar 739. Zwischen den Basenpaaren 828 und 1129 liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungsstelle befindet sich am Basenpaar 2658.

Fig. 3 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines 334 Aminosäuren umfassenden X5L-Proteins. Die DNA-Sequenz ist eine Maus cDNA.

Fig. 4 zeigt die Sequenz einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem Maus Genom. Die cDNA von Fig. 3 beginnt am Basenpaar 445 von Fig. 4(A). Zwischen den Basenpaaren 492-1232 von Fig. 4(A) liegt ein Intron vor. Zwischen den

Basenpaaren 1-1136 von Fig. 4(B) liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich am Basenpaar 2306 von Fig. 4(B).

5 **Fig. 5** zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben.

10 **Fig. 6** zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden. Das Vorliegen solcher mRNA ist auf Tubuli begrenzt (Fig. 6(A)). Auf zellulärer Ebene liegt mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatoyten (Sterne) sowie runden Spermatiden (RS) vor. Reife Spermien sind mit (MS) und Spermatogonien mit (Pfeilspitzen) gekennzeichnet. Sertoli-Zellen (Pfeile) und Leydig-Zellen (L) weisen keine mRNA eines X5L-Proteins auf.

20 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben (A)

25 RNA-Blots von humanen Geweben, wie Pankreas, Nebennierenmark, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Hoden, Thymus, Dünndarm, Magen, fötales Gehirn, fötale Lunge, fötale Leber und fötale Niere, erhalten von Clontech, werden einer Hybridisierung unterzogen. Als Hybridisierungsprobe wird eine [α^{32} P]dCTP markierte X5L-Protein spezifische DNA verwendet, die 30 zwischen den Basenpaaren 1073-1409 der DNA von Fig. 1 liegt. Die Hybridisierung erfolgt übernacht mit anschließenden Waschschritten unter üblichen Bedingungen. Zur Kontrolle werden die Blots ebenfalls mit einer radioaktiven β -actin-Probe hybridisiert (vgl. Fig. 5).

35 Es zeigt sich, daß mRNA eines X5L-Proteins in den verschiedensten Geweben exprimiert wird. Die Größe der exprimierten mRNA ist 1,7 bzw. 4,3 kb, was auf

unterschiedliche Polyadenylierungssignale der DNA von Fig. 1 zurückzuführen ist. Ferner zeigt es sich, daß die Expression von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden am stärksten ist.

5 (B)

Es wird eine RNA in situ Hybridisierung an Maus-Hoden-Gewebe durchgeführt. Hierzu wird auf das Verfahren von Wilkinson, D.G. (1992), Oxford University Press, New York verwiesen. Es werden "antisense"- bzw. "sense" RNA Proben verwendet, die den
10 Basenpaaren 5-1169 der DNA von Fig. 1 entsprechen.

Es zeigt sich, daß in Hoden-Gewebe eine starke Expression von mRNA eines X5L-Proteins stattfindet. Ferner zeigt sich, daß die Expression auf Tubuli beschränkt ist. Auf zellulärer Ebene
15 zeigt sich eine Expression von mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Spermatogonien, reife Sertoli-Zellen und Leyding-Zellen zeigen dagegen keine Expression von mRNA eines X5L-Proteins.

20

Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein)

25 Die DNA von Fig. 1 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/X5L erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner)
30 und dem erfindungsgemäßen X5L-Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/X5L wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und
35 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M

Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

B i s p i e l 3: H e r s t e l l u n g u n d N a c h w e i s e i n e s erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 37 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
 icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
 Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper

nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

- 5 Pro Immunisierung werden 12µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.
- 10 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
- 15 Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

- 5 1. Spermato-genese-Protein, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.
- 10 2. Spermato-genese-Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 3.
3. DNA, kodierend für das Spermato-genese-Protein nach Anspruch 1, umfassend:
15 (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein Spermato-genese-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 %
20 zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
- 25 4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA jene von Fig. 2, Fig. 3 oder Fig. 4 ist.
5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
- 30 6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 35 7. Verfahren zur Herstellung eines Spermato-genese-Proteins, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Spermato-genese-Protein nach Anspruch 1 oder 2.

9. Verwendung des Spermatogenese-Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder einer DNA nach Anspruch 3 oder 4 zur Untersuchung bzw. Beeinflussung von Spermatogenese.
- 5 10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Beeinflussung der Spermatogenese ihre Aktivierung bzw. Inhibierung umfaßt.
11. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese eine Diagnose bzw. 10 Behandlung von Störungen der Spermatogenese umfaßt.

K 2606

Zusammenfassung
Spermatogenese-Protein

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.

10 30 50 70 90
AGAGCCCGGGCGAGTGGGCTCTGCTCGTGGGTGGTTCTCGTGAGGTCAGCTCCCGCGTGTCTCCGCTCGACAGGGTGCTTGGGCAGAA

110 130 150 170
GCCCATCGGCTAGGCGCGGGCCATGGCGCAGTACAAGGGCCCATGCGCGAGGCAGGCCGTGCCATGCACCTCTCTCAAGAAAGCGCGAAAG
M A Q Y K G T M R E A G R A M H L L R K K E R

190 210 230 250 270
GCAGCGGGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCTGAGGAGACCATCTCAAGTCCAGGTGGAACAAGAGGTCTCTCGGCGCATTAA
Q R E Q M E V L K Q R I A E E T T L K S Q V D K R F S A H Y

290 310 330 350
CGACGCCGTGGAGCGCGAGCTGAAGTCCAGCACGGTGGGCTCTGTGACCTGAACGACATGAAGGCCCGGCAGGAGGCCCTGGTCAGGGA
D A V E A E L K S S T V G L V T L N D M K A R Q E A L V R E

370 390 410 430 450
GCGCGAGCGGCAGCTGGGCAAGCGCCAGCACCTGGAGGACAGCGGCTGCAGCAGGAGCGGCAGCGGGAACAGGAGCAGCGGCGCGAGCG
R E R Q L A K R Q H L E E Q R L Q Q E R Q R E Q E Q R R E R

470 490 510 530
CAAGCGTAAGATCTCTCTGCTCTCTTTGCACTAGACGACCTCGATGACCAAGGCCGACGCGCCGAGGCCAGGCGCGCCGAAACCTGGG
K R K I S C L S F A L D D L D D Q A D A A E A R R A G N L G

550 570 590 610 630
CAAGAACCCCGACGCTGGACACCGACTTCTTGGCAGACCGCGACCGGAGGAGGAGAGAACCAGCTCCGAGAGGAGCTGCCCAAGAGTG
K N P D V D T S F L P D R D R E E E E N R L R E E L R Q E W

650 670 690 710
GGAGCGCAGCGCGAGAAAGTGAAGGACGAGGAGATGGAAGTCACTTCACTACTGGGACCGGCTCGGGCCACCGCGCACGGTGCGGGT
E A Q K E K V K D E E M E V T F S Y W D G S G H R R T V R V

730 750 770 790 810
GCGCAAGGGCAACACGGTGCAGCAGTTCTTGAAGAAGGCGCTGCAGGGGCTGCGCAAGGACTTCTTGAAGCTGCGCTCCGCGCGCGTGA
R K G N T V Q Q F L K K A L Q G L R K D F L E L R S A G V E

830 850 870 890
GCAGCTCATGTTTCATCAAGGAGGACCTCATCTCGCCGCACTACCAACCTTCTACCACTTCATCATCGCCAGGGCGAGGGGCAAGAGCGG
Q L M P I K E D L I L P H Y H T F Y D F I I A R A R G K S G

910 930 950 970 990
GCGGCTCTTCAAGCTTCGATGTGCAGGATGACGTGCGGCTGCTCAGCGACGCCACCATGGAGAAGGACGAGTGCACGCGGGCAAGGTGGT
P L F S F D V H D D V R L L S D A T M E K D E S H A G K V V

1010 1030 1050 1070
GCTGCGCAGCTGGTACGAGAAGAAACAAGCACATCTTCCCCGCCAGCCGCTGGGAGGCCCTATGACCCCGAGAAGAAGTGGGCAAGTACAC
L R S W Y E K N K H I F P A S R W E A Y D P E K K W D K Y T

1090 1110 1130 1150 1170
CATCCGCTAACACCCGCTGCCAGAGCGGAAACCGGGGGTGGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCCATCACAGTCACTTGATTTCGTG
I R

1190 1210 1230 1250
ACCTTGATTTCTTCCCCCAATTTAATAAAGACAGAGGGTTCTCATGATTCACATTGGTTGTGCTATTGCTGATGTTATGCTTTGGTTGC
1270 1290 1310 1330 1350
TTGGTTGGTCTTTCTGAGTATTTTAGTGTGCCACCTGGATTGCTGCATTGCTCTGCTGAGCTGTATTGAAACCATGACTGGGCCCCAC
1370 1390 1410 1430
TGTCAGACAGAAATTAGAATAGGAGGCACATTTTACCTGGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCC
1450 1470 1490 1510 1530
GACACAGCCCTCTCTGTGCTGTAGTTTGGGTAAGCTTATTAAACCCCATGCGCTCAGTTTGGTCACCTGTAAAAGGAAATAACAAGA
1550 1570 1590 1610
GCACTTACTTTATAAGATTGATGTGAGTATTAAGTGAATTAATATTTGTAACCGCTTAGCTCTTAATAAATGTTTCTGTGTTTATTA

Fig. 1

10 30 50 70 90
 GAAACGGTCACGAAACATGA¹⁰ACTGGTCTG³⁰C⁵⁰CTGCTCTTGGAGAGTTAC⁷⁰AGTGGAACTGGCATGTTAGAGGCTCACAGTAAAGACACTG⁹⁰
 110 130 150 170
 CTACACTTTAACTCAGTGTCCCATGGTTATTAGAGCTTAGAACCCGGGGGAAACTGCTGTATAGAAGAGGTCAAAACAAGCTGAGTGCAGG¹⁷⁰
 190 210 230 250 270
 TTTTGTACGAAACTGGGGGGCGAGTAGGGTCTATATCAAGAATGGTTGTGTTGGGGCCATAAGAAAGAATTACAGGCAGTGGTGGC²⁷⁰
 290 310 330 350
 CAGGTAATGTTACGAGACGCCACAGCGGGTAGCATCAGAGCGGGAGGAGGAGGGTTGGAGAGCAGGGCCGTGTTGCAAGGCCTCTCTG³⁵⁰
 370 390 410 430 450
 GGTGGCCACAGCAGCTTGCCTGCGCCCAATTGCTTCTGCGTGTTCAGCTGGGCACGAGAAGGCTCAGCACGCACGCACAGCAGGTG⁴⁵⁰
 470 490 510 530
 GGGGCCCCCTGCCCCACAGCCTGAAACAGGAGCCCCGGCCAGCCACGGCTGGGCAGGGCCAGAAGCGCTCCTCCAGGATCCTCCCCG⁵³⁰
 550 570 590 610 630
 CGCTGGCCCCCCCCACAGGAGCACCGCCCCCTACCAGGAGCCCCGAGCTCTTCCAGGGCCCGCTCCCCGCCAGGGGGCGATCCACCTCC⁶³⁰
 650 670 690 710
 ACTTCCTGTATCCCGCAGCCGCCCTACCAGGAGCCTGGCACTCTCCTCAGGGCCCGCTCCCCGCCAGGGGGCGCACCGGCCTCCACTTCCT⁷¹⁰
 730 750 770 790 810
 GTGTCCACGGCTGTGCGAGAGCCCCGGGGCAGTGGGCTCTGCTCGTGGGTGCTTCTCGTGCAGGTCACTCCCCGCTGTCTCCGCTCG⁸¹⁰
 830 850 870 890
 ACAGGGTGTCTGGGAGGTAAAGGTCCGCTCAGTAGCCCAACCTCTCTGTATGCAGCTCCCCAAATTCAGCGCTCGCTCAGGCATGGC⁸⁹⁰
 910 930 950 970 990
 AGCCACCCGTTACGTGGGGCGCTTCGCATTTGCATTTATTGAGCTCAAATAAAATGCTGGAATTCGGTGCCTGGTGACACTGTGAGGTTG⁹⁹⁰
 1010 1030 1050 1070
 GTGGTTACCTTAGCAGGTCCGCCCAGCCCCCTGAACGCTTCCATCACTGCCGAAAGCCCTGTGAGGAGGCGCAGAGCTGAGCATTTCCCGC¹⁰⁷⁰
 1090 1110 1130 1150 1170
 CGTTGCGTGGGCCCCCTCTACCTGCGCGCTTTTCTCTTTGCTGCAGAGCCCATCGGTAGGCGCGGGCCATGGCGCAGTACAAGGGC¹¹⁷⁰
 1190 1210 1230 1250
 ACCATGCGCGAGGCGAGGCCGCTGCCATGCACCTCTCTCAAGAGCGCGAAAGCGCAGCGGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCC¹²⁵⁰
 1270 1290 1310 1330 1350
 GAGGAGACCATCTCAAGTCCGAGGTGGAACAAGAGGTTCTCGGCGCATTACGACGCGGTGGAGGCCGAGCTGAAGTCCAGCACGGTGGGC¹³⁵⁰
 1370 1390 1410 1430
 CTGGTGACCTGAACGACATGAAGCCCCGCGCAGGAGCCCTGGTCAGGAGCGCGAGCGGCGAGCTGGCCAGCGCCAGCACCTGGAGGAG¹⁴³⁰
 1450 1470 1490 1510 1530
 CAGCGGCTGCAGCAGGAGCGCGAGCGGGAGCAGGAGCAGCGCGGAGCGCAAGCGTAAGATCTCTGCTGTCTCTTTGCACTAGACGAC¹⁵³⁰
 1550 1570 1590 1610
 CTCGATGAC¹⁵⁵⁰CAGGCCGACGCGGCGGCGAGGCCAGGCGCGCCGAAACCTGGGCAAGAACCCCGACGTGGACACCAGCTTCTTCCAGACCGC¹⁶¹⁰
 1630 1650 1670 1690 1710
 GACCGCGAGGAGGAGGAGAACCGCTCCGAGAGGAGCTGCGCCAGAGTGGGAGGCGCACCGCGAGAAAGTGAAGGACGAGGAGATGGAG¹⁷¹⁰
 1730 1750 1770 1790
 GTCACCTTCAGCTACTGGGACGGCTCGGGCCACCGCGCACGGTGGGGTGGCGAAGGGCAACACGGTGCAGCAGTTCCTGAAGAAGGCG¹⁷⁹⁰
 1810 1830 1850 1870 1890
 CTGCAGGGGCTGCGCAAGGACTTCTCTGCACTGCGCTCCGCGCGCTGGAGCAGCTCATGTTTCATCAAGGAGCACCTCATCTTCCGCGAC¹⁸⁹⁰
 1910 1930 1950 1970
 TACCACACCTTCTACGACTTCATCATCGCCAGGGCGAGGGGCAAGAGCGGGCGCTCTTTCAGCTTCGATGTGCACGATGACGTGCGCCTG¹⁹⁷⁰
 1990 2010 2030 2050 2070
 CTCAGCGACGCCACCATGGAAGAAGGACGAGTCGCACGCGGGCAAGGTGGTGTGCTGCGCAGCTGGTACGAGAGAACAAGCACATCTTCCCC²⁰⁷⁰
 2090 2110 2130 2150
 GCCAGCCGCTGGGAGGCTTATGACCCCGAGAAGAAGTGGGACAAGTACACCATCCGCTAACCCCGCTGCCAGAGCGGAAACCGGGGGT²¹⁵⁰
 2170 2190 2210 2230 2250
 GGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCCATCACAGTCACTTGATTCTGTGACCTTGATTCTTCCCCCAATTTAATAAAGACAGAGGGT²²⁵⁰
 2270 2290 2310 2330
 TCTCATGATTACATTGGTGTGCTATTGCTGATGTTATGCTTGGTTGCTTGGTGGTCTTTCTGAGTATTTTAGTGTTGCCACCTGG²³³⁰

Fig. 2

Fig. 2 (Fortsetzung)

2350 2370 2390 2410 2430
ATTTGCTGCATTGCTCTGCTGAGCTGTATTGAAACCATGACTGGGCCCCACTGTCAGACAGAAATTAGAATTAGGAGGCACATTTTTTACCT
2450 2470 2490 2510
GGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCCCGACACAGCCTCCTCCTTGCTGTGTAGTTTGGGTAAGCTT
2530 2550 2570 2590 2610
ATTAAACCCCATGCCCTCAGTTTGGTCACCTGTAAAAGGAAATAACAAGAGCACTTACTTTATAAGATTGATGTGAGTATTAAGTGAATT
2630 2650 2670 2690
AATATTGTAAAACGCTTAGCTCTTAATAAATGTTTCTGTTGTTATTATTATGGTTTTGGTTAATTTATTAAAGGACTGCAATGACCTA
2710 2730 2750 2770 2790
GTTCAGAACTATTTGAGGGCAAAGGTGGACCTGCCCATCCTGGTCCCAGGATCAGCAGTTGCCAGCAGGAGGGGGCTAGCAAAGGTTGG
2810 2830 2850 2870
GGAGCAGCCCCCTCTAGTGGGCTTTAGCTGGGTGTTTAGCCCAAGTTAGGAGGACAGTGAGCTAATGCAAGTAGCCTGCAG

10 30 50 70 90
 ATTTCGCAAAAGCACCAGAAGGAAGAGTCTTGGCTCATACATCAAAAGCTGCAGAAATCTGTGAAGTGCATTCAGACCCAGAGGGCTACCAG
 110 130 150 170
 AAACAGGGAGCTGGGCAGGCCAAAAAGCCTTGGCGTGAAGCTGCAGGCATGGCGCAGTACAAGGCACCATGCGGGAAGCTGCGCGGGCCAT
 M A Q Y K G T M R E A G R A M
 190 210 230 250 270
 GCACCTGATCAAGAAGCGTGAGAAGCAGAAGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCAGAGGAGACCATCATGAAGTCAAAAGT
 H L I K K R E K Q K E Q M E V L K Q R I A E E T I M K S K V
 290 310 330 350
 GGACAAGAAGTTCTCGGCACACTACGACGCCCTGGAGGCCGAGCTGAAGTCCAGTACGGTGGGCTGGTGACCTGAATGACATGAAGGC
 D K K F S A H Y D A V E A E L K S S T V G L V T L N D M K A
 370 390 410 430 450
 CAAGCAGGAGGCCCTGCTGAGGGAGCGGAGATGCAGCTGGCCAGAGGGAGCAGCTGGAGCAACGCCGGATACAGCTGCAGATGCTGCC
 K Q E A L L R E R E M Q L A K R E Q L E Q R R I Q L E M L R
 470 490 510 530
 CGAGAAGGAGCGAAGGCGAGAGCGCAAGCGCAAGATCTCCAACTGTCTTTCACGTTGGACGAGGAAGAAGGTGACCAAGAGGACAGCCG
 E K E R R R E R K R I S N L S F T L D E E E G D Q E D S R
 550 570 590 610 630
 CCAAGCCGAGAGTGCCGAGGCCACAGTCTGGAGCCAGAAGAACTTGGGCAAGAATCCCGATGTGGAACACGAGCTTCTGCCCCGACCG
 Q A S S A E A R S A G A K K N L G R N P D V D T S F L P D R
 650 670 690 710
 CGAGCCGAGGAGGAGGAGGAACCGTTGCGCGAGGAAGTGGCGCAGGAGTGGGAGGCGAAGCGCGAGAAGGTGAAGGGCGAGGAGGTGGA
 E R E E E E N R L R E E L R Q E W E A K R E K V K G E E V E
 730 750 770 790 810
 GATCACCTTCAGCTACTGGGATGGCTCCGGCCACCGGCGACCGGTGGGCATGAGCAAGGGCAGCACCGGTGCAGCAGTTCTCTGAAGCGGGC
 I T P S Y W D G S G H R R T V R M S K G S T V Q Q F L K R A
 830 850 870 890
 GCTGCAGGGGCTGCGCAGGGACTTCCGGGAGCTGCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACGTCAAGGAGGATCTCATCTGCGCGA
 L Q G L R R D F R E L R A A G V E Q L M Y V K E D L I L P H
 910 930 950 970 990
 CTATCACACCTTCTACGACTTCATCGTGGCCAAAGCCCGGGGCAAGAGCGGCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGACGATGTGCGGCT
 Y H T F Y D F I V A K A R G K S G P L F S F D V H D D V R L
 1010 1030 1050 1070
 GCTGAGCGATGCCACGATGGAGAAAGATGAGTCACACCGCGGCAAGGTGGTGCTTCCAGCTGGTACGAGAAGAACAAGCACATCTTCCC
 L S D A T M E K D E S H A G K V V L R S W Y E K N K H I F P
 1090 1110 1130 1150 1170
 TGCCAGCCCGCTGGGAGCCCTACGACCCCGAAGAAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCAGTTTGGGGACCTTACTC
 A S R W E P Y D P E K K W D R Y T I R
 1190 1210
 CCTAACTATCGAAAATTAAATAATACAGAGGGTCCCCGTAAATCGGA

Fig. 3

10 30 50 70 90
 CTA AAA C C T G A A A G T T A T T C T G A T C A A C C A T A C T A T A C C A C A T G C A A A A T G G A G T C A G A G C T T T C T G T C T C C T C T G T A G C T A A G A T C A C T
 110 130 150 170
 A A T G A G T T A T T G T A T G A A A A G G C A A T A A A T C A T G C T G T C T G G A G A G T G C C A A T A C T T T C A G A C T A G T G T A T C A C G T A A A C T C T T T A G T A
 190 210 230 250 270
 A C A A C C T A C A C A C A A A A T T T A A T C T G T A A T A A T C A A A G G C C C A A G T G A G C A A C G A C A G T C C A G G A A A A C T T C A T G G G A G G A T T G C A T T T
 290 310 330 350
 C A G T T G T C A G G A G A T C A G A C C C T G G C A G C A G G A C T G C A T C C A T C A G T C A G T C C A A G T C G G C A G T T A T A C A T G A C C A C C A C C T G A T T G G C C
 370 390 410 430 450
 C A A T C T C T G T C C T G A T T G G T T A G A G C C T G C C C T A G C A G T G G C C A A T G T T T G C A T A T T T C T G T G T C A G T T A G A A C A A A C A A T A T T C G C
 470 490 510 530
 A A A A G C A C C A G A A G G A A G A G T C T T G G C T C A T A C A T C A A A A G G T G A G G G A C T G G C T T G A A T C C A G C T G G G C A G A T G T G G A G G T A C A G C
 550 570 590 610 630
 T C T T T A A A C T C G A G T A A A A C C A A T T G T G A A G G G A G T T G A A T G T T A G A G G A A A G G A A T T T G T C C A T T A T C C T G C A A G C A G G G G A G A C T A A T
 650 670 690 710
 G A G C C C T A T C G G T G A C A T A A T A T C A A C A T T T T A T T G T A A T T A G G A A T C A C A A A C T A G C A G G A A G G A G G A A G A T G C C T T A A A G G G C T A T
 730 750 770 790 810
 G A C A T A T G C A C T A G G A A A A T A G A A A T T G G G C C T T G T T C T C T A T T G G T T G C T T T T C A C T G C T G T G T C A A A A G C A A C C T A A G G A G G A G G A
 830 850 870 890
 A A G G G T T A T T T T G A T T G A C T G T T G A C T C A C A T T T A A T C C T G A C A G C A A G T T G G C A G A A G C A C G G A G T C A T G T T G T T C T G T A G T C A G A
 910 930 950 970 990
 A A G C C G A G C A A G A T A A G G A C T G C G T T C A T C T G C C T T T C C C T A T T T C T C C T T C T A C T A G G T C T G A G A C T C A C G C C C A T G G G C A T G G T A A G
 1010 1030 1050 1070
 G C C A T G T C A A G A T G G T T T G T C T T C C T C A G T T A A A T C T T T C T G A A A A T A C T C C C A C C A G A C A A C A T G C C A A G A G C T G T G T A T C C T A A G G
 1090 1110 1130 1150 1170
 T T C C A A A T C C T G T T A G T T G A C A A G A T T A A C C A T T A C A T G A G T C T C A C C T C C T T A A C T C A G G T C T G A T A C T G T T A G C T T A T A G T A C T G A A A
 1190 1210 1230
 G C A T A C T G A A G G C T T C T G T C T C T G C T A G A T T G C T C T G A A C T C C T C T T T T C T G C C A C T G C A G

Fig. 4 (A)

[illegible]

Fig. 4 (B)

1910 1930 1950 1970
 GAAGCGGGCGCTGCAGGGGCTGCCAGGGACTTCCGGGAGCTGCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACGTCAAGGAGGATCTCAT
 1990 2010 2030 2050 2070
 CCTGCCGCACTATCACACCTTCTACGACTTCATCGTGGCCAAAGCCCGGGGCAAGAGCGGCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGACGA
 2090 2110 2130 2150
 TGTGCGGCTGCTGAGCGATGCCACGATGGAGAAAGATGAGTCACACGCGGGCAAGGTGGTGCTTCGCAGCTGGTACGAGAGAAACAAGCA
 2170 2190 2210 2230 2250
 CATCTTCCCTGCCAGCCGCTGGGAGCCCTACGACCCCSAGAAAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCAGTTTGGGG
 2270 2290 2310 2330
 ACCTTACTCCCTAACTATCGAAAAATTAATAAATACAGAGGGTCCCCGTAAATCGGATGTGTGGTTCTGTACCTGGCGTCATTCTTCGGT
 2350 2370 2390 2410 2430
 GTTTTTAATGTTCTGTTGTGGCTCCTTGTGTCTGTGTGAAAAGGGACATGTTTGTGACTAAGTGGGTGTGTCACATTAGCTTGGTG
 2450 2470 2490 2510
 GGCCAGCAGACTGGGTTTGATTTTCTTGCTCAATGTCTTACTGTGTGTGTGAGCAAAATCATTTGCCGTCAATTGACTCCTTTTCCCCACC
 2530 2550 2570 2590 2610
 TATACAAGGAAGTTACACCCCTTCAGGCCAGCGTGAGGAGTGAGTTAATATTGTAAACACTTGGAACTCACTCAGTAAATGCCCTGCTGT
 2630 2650 2670 2690
 TTTTGTGGGCTGGTTGCTTTACTAAAGAATGCCTACCGCATCCATCTCTGAAATGTCAAACCAGGGTAGACCTGCATATGTATTGGT
 2710 2730 2750 2770 2790
 TTCAGGGTCAGTCGGTGCCCTGAAAGCTGGTGTACAGCTTATAAGATCGGAGGCGCTTATTTTCTTATCTTCACCCAAAGCTCACATCTA
 2810 2830 2850 2870
 CATGGCAAGATTCTAAATCCCGCCCTTAAAGTTTGTATATGTTATTCATTGTTGAGTGTTTTGTTAATTTTCACTTAAAAACGTCTAAAA
 2890 2910 2930 2950 2970
 TACAGTGCATCTCTTCACGGATTTTTTTAAGTTACCCCTTTTATGTAAAGACCAAGACTTATACTTTGGATCTCTTGCTCTGTTCTGT
 2990
 GCGCTGAGTACTTGGCCAGCCCAAGAACATGAATTC

Fig. 4 (B) Fortsetzung)

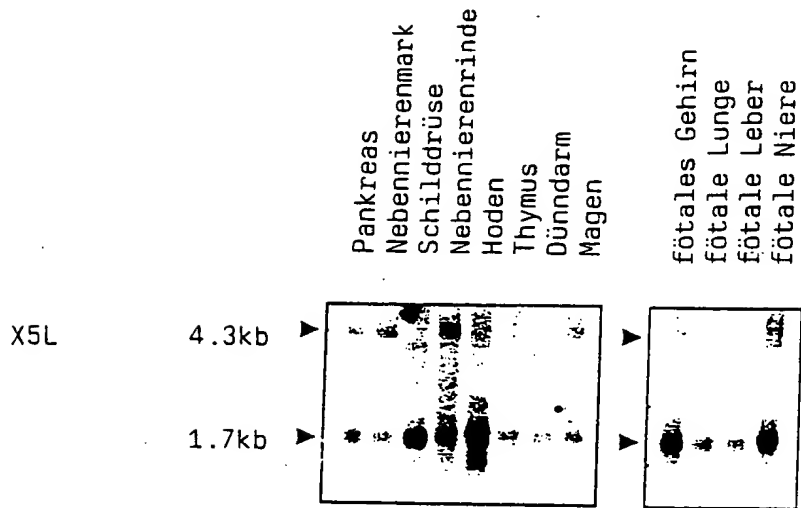


Fig. 5

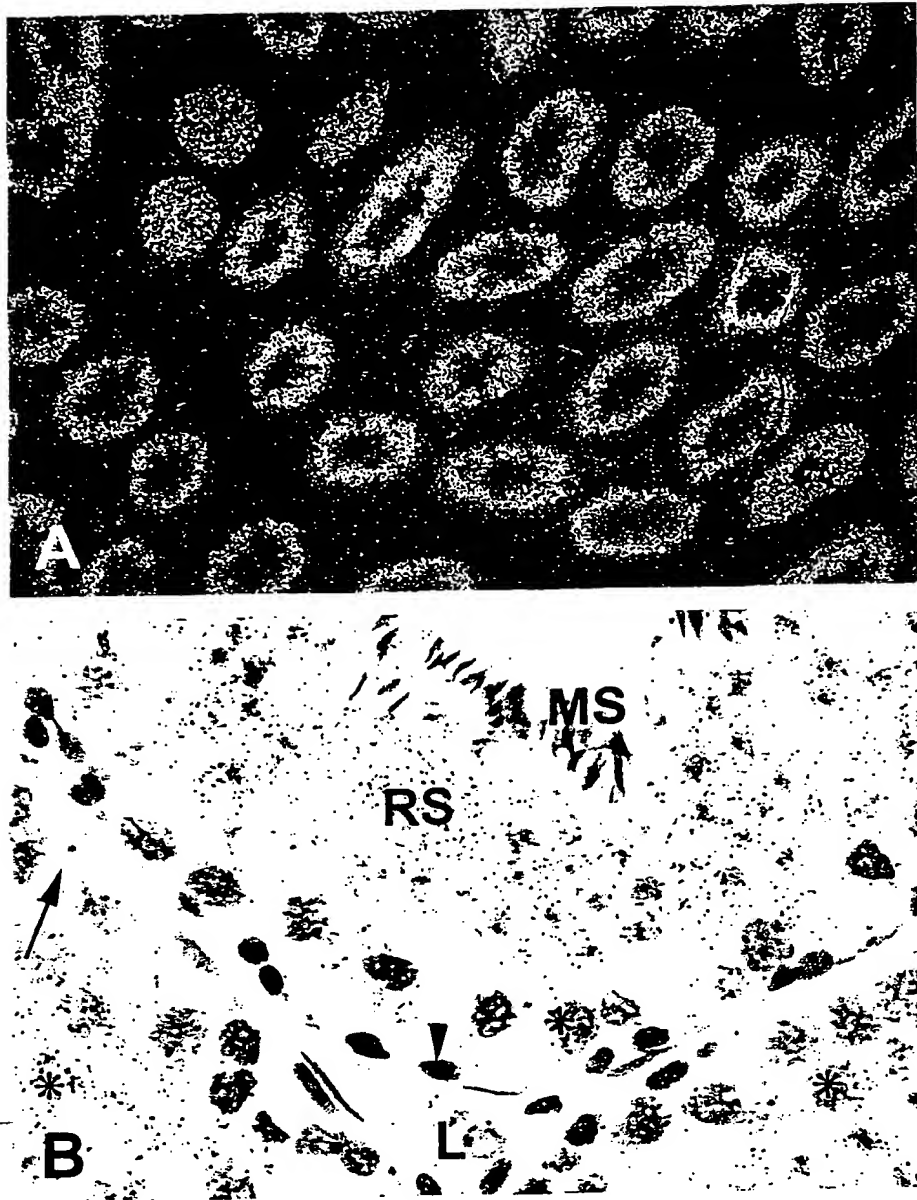


Fig. 6

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Spermatogenese-Protein

<130> K 2767

<140> PCT/DE99/03972

<141> 1999-12-08

<150> DE 198 56 882.7

<151> 1998-12-10

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 1618

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (113)..(1087)

<400> 1

```

agagccccggg gcgagtgggc ctctgctcgt ggggtggttct cgtggaggtc agtccccgcg      60
tgtctccgct cgacaggggtg cttgggcaga gccatcggg taggcgcggg cc atg      115
                                   Met
                                   1

gcg cag tac aag ggc acc atg cgc gag gca ggc cgt gcc atg cac ctc      163
Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His Leu
                                   5
                                   10
                                   15

ctc aag aag cgc gaa agg cag cgg gag cag atg gag gtg ctg aag cag      211
Leu Lys Lys Arg Glu Arg Gln Arg Glu Gln Met Glu Val Leu Lys Gln
                                   20
                                   25
                                   30

cgc atc gcc gag gag acc atc ctc aag tcg cag gtg gac aag agg ttc      259
Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ser Gln Val Asp Lys Arg Phe
                                   35
                                   40
                                   45

tcg gcg cat tac gac gcc gtg gag gcc gag ctg aag tcc agc acg gtg      307
Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr Val
                                   50
                                   55
                                   60
                                   65

ggc ctg gtg acc ctg aac gac atg aag gcc cgg cag gag gcc ctg gtc      355
Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Arg Gln Glu Ala Leu Val
                                   70
                                   75
                                   80

agg gag cgc gag cgg cag ctg gcc aag cgc cag cac ctg gag gag cag      403
Arg Glu Arg Glu Arg Gln Leu Ala Lys Arg Gln His Leu Glu Glu Gln
                                   85
                                   90
                                   95

```


cgg ctg cag cag gag cgg cag cgg gag cag gag cag cgg cgc gag cgc Arg Leu Gln Gln Glu Arg Gln Arg Glu Gln Glu Gln Arg Arg Glu Arg 100 105 110	451
aag cgt aag atc tcc tgc ctg tcc ttt gca cta gac gac ctc gat gac Lys Arg Lys Ile Ser Cys Leu Ser Phe Ala Leu Asp Asp Leu Asp Asp 115 120 125	499
cag gcc gac gcg gcc gag gcc agg cgc gcc gga aac ctg ggc aag aac Gln Ala Asp Ala Ala Glu Ala Arg Arg Ala Gly Asn Leu Gly Lys Asn 130 135 140 145	547
ccc gac gtg gac acc agc ttc ctg cca gac cgc gac cgc gag gag gag Pro Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Asp Arg Glu Glu Glu 150 155 160	595
gag aac cgg ctc cga gag gag ctg cgc caa gag tgg gag gcg cag cgc Glu Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Gln Arg 165 170 175	643
gag aaa gtg aag gac gag gag atg gag gtc acc ttc agc tac tgg gac Glu Lys Val Lys Asp Glu Glu Met Glu Val Thr Phe Ser Tyr Trp Asp 180 185 190	691
ggc tcg ggc cac cgg cgc acg gtg cgg gtg cgc aag ggc aac acg gtg Gly Ser Gly His Arg Arg Val Val Arg Val Arg Lys Gly Asn Thr Val 195 200 205	739
cag cag ttc ctg aag aag gcg ctg cag ggg ctg cgc aag gac ttc ctg Gln Gln Phe Leu Lys Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Lys Asp Phe Leu 210 215 220 225	787
gag ctg cgc tcc gcc ggc gtg gag cag ctg atg ttc atc aag gag gac Glu Leu Arg Ser Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Phe Ile Lys Glu Asp 230 235 240	835
ctc atc ctg ccg cac tac cac acc ttc tac gac ttc atc atc gcc agg Leu Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Ile Ala Arg 245 250 255	883
gcg agg ggc aag agc ggg ccg ctg ttc agc ttc gat gtg cac gat gac Ala Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp 260 265 270	931
gtg cgc ctg ctc agc gac gcc acc atg gag aag gac gag tcg cac gcg Val Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala 275 280 285	979
ggc aag gtg gtg ctg cgc agc tgg tac gag aag aac aag cac atc ttc Gly Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe 290 295 300 305	1027
ccc gcc agc cgc tgg gag gcc tat gac ccc gag aag aag tgg gac aag Pro Ala Ser Arg Trp Glu Ala Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Lys 310 315 320	1075
tac acc atc cgc taacacccgc ctgccagagc ggaaaccggg ggtgggggga Tyr Thr Ile Arg 325	1127
gacactcatt tctaggcccc atcaccagtc acttgatttc gtgacettga tttcttcccc	1187
caaatttaat aaagacagag gggtctcatg attcacattg gttgtgctat tgctgatgtt	1247
atgcttttgggt tgcttggttg gtcttttctg agtatttttag tgttgccacc tggatttgct	1307
gcattgctct gctgagctgt attgaaacca tgactgggccc cactgtcaga cagaaattag	1367

aataggaggc acatttttta cctgggtggtt atgagcatgg acttgggggc cacagtgact 1427
 gagtttgatt cccgacacag cctcctcctt gctgtgtagt tttgggtaag cttattaaac 1487
 ccccatgcct cagtttggtc acctgtaaaa ggaaataaca agagcactta ctttataaga 1547
 ttgatgtgag tattaagtga attaatatatt gtaaaacgct tagctcttaa taaatgtttc 1607
 tgttgttatt a 1618

<210> 2
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 2

Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His
 1 5 10 15
 Leu Leu Lys Lys Arg Glu Arg Gln Arg Glu Gln Met Glu Val Leu Lys
 20 25 30
 Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ser Gln Val Asp Lys Arg
 35 40 45
 Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr
 50 55 60
 Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Arg Gln Glu Ala Leu
 65 70 75 80
 Val Arg Glu Arg Glu Arg Gln Leu Ala Lys Arg Gln His Leu Glu Glu
 85 90 95
 Gln Arg Leu Gln Gln Glu Arg Gln Arg Glu Gln Glu Gln Arg Arg Glu
 100 105 110
 Arg Lys Arg Lys Ile Ser Cys Leu Ser Phe Ala Leu Asp Asp Leu Asp
 115 120 125
 Asp Gln Ala Asp Ala Ala Glu Ala Arg Arg Ala Gly Asn Leu Gly Lys
 130 135 140
 Asn Pro Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Asp Arg Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Glu Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Gln
 165 170 175
 Arg Glu Lys Val Lys Asp Glu Glu Met Glu Val Thr Phe Ser Tyr Trp
 180 185 190
 Asp Gly Ser Gly His Arg Arg Thr Val Arg Val Arg Lys Gly Asn Thr
 195 200 205
 Val Gln Gln Phe Leu Lys Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Lys Asp Phe
 210 215 220
 Leu Glu Leu Arg Ser Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Phe Ile Lys Glu
 225 230 235 240
 Asp Leu Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Ile Ala
 245 250 255



Arg Ala Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp
 260 265 270

Asp Val Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His
 275 280 285

Ala Gly Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile
 290 295 300

Phe Pro Ala Ser Arg Trp Glu Ala Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp
 305 310 315 320

Lys Tyr Thr Ile Arg
 325

<210> 3
 <211> 2875
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 3

gaaacggtca cgaaacatga actggtctgc cctgctcttg gagagttaca gtggaaactg 60

gcatgttaga ggctcacagt aaagacactg ctacacttta actcagtgtc ccatggttat 120

tagagcttag aaccggggg aaactgctgt atagaagagg tcaaacaagc tgagtgcagg 180

ttttgtcacg aaactggggg gcgagtaggg ttctattatc aaagaatggg tgtgttgggg 240

ccataagaaa gaattacagg cagtgggtgcg caggtaatgt tcacgagacg ccacagcggg 300

gtagcatcag aggcgggagg aggagggttg gagagcaggg ccgtgttgca aggctctctg 360

ggtggccaca gcagcttgcg ctgcgccac attgcttctg cgtgtttaca gctgggcacg 420

agaaggctca gcacgcacgc acagcaggtg ggggcgccg ctgcccacag cgtgaaaaca 480

ggagccccgg ccagccacgg ctgggcaggg ccagaagcgc ctctccagg atcctccccg 540

cgctggcccc cccacagga gcaccgcccc taccaggagc cgggagctct tcccagggcc 600

cgctccccg ccagggggcg atccacctcc acttctgtt tccgcagcgg ccctaccagg 660

agcctggcac tctctcagg gcccgctcc ccgccagggg gcgcaccgcc tccacttctt 720

gtgtccacgg ctgtcgcgag agcccgggg gagtgggcct ctgctcgtgg gtggttctcg 780

tggaggtcag ctcccgctg tctccgctcg acagggtgct tgggcaggta agggcccgct 840

cagtagccca accctctctg tatgcagctc cccaaattca gcgtgctgct caggcatggc 900

agccaccggt tacgtggggc cgctcgcat tgcatttatt gaggtcaaataaaaatgctgg 960

aaattgggtg ctggtgacac tgtcaggttg gtggttaccc tagcaggtcg gccagcccc 1020

tgaacgcttc catcactgcc gaaagccctg tgaggaggcg cagagctgag cattccccgc 1080

cgttgcgtgg gccccctct acctgccggt ttttctctt ttgctgcaga gcccatcggt 1140

taggcgcggg ccatggcgca gtacaagggc accatgcgag aggcaggccg tgccatgcac 1200

ctctcaaga agcgcgaaag gcagcgggag cagatggagg tgctgaagca gcgcacgccc 1260

gaggagacca tcctcaagtc gcaggtggac aagaggttct cggcgatta cgacgcggtg 1320

gaggccgagc tgaagtccag cacggtgggc ctggtgaccc tgaacgacat gaaggcccgg 1380
 caggaggccc tggtcagggg gcgcgagcgg cagctggcca agcgccagca cctggaggag 1440
 cagcggctgc agcaggagcg gcagcgggag caggagcagc ggcgcgagcg caagcgtaag 1500
 atctcctgcc tgtcctttgc actagacgac ctcgatgacc aggccgacgc ggccgaggcc 1560
 aggcgcgccc gaaacctggg caagaacccc gacgtggaca ccagcttcct gccagaccgc 1620
 gaccgcgagg aggaggagaa ccggctccga gaggagctgc gccaagagtg ggaggcgag 1680
 cgcgagaaaag tgaaggacga ggagatggag gtcaccttca gctactggga cggctcgggc 1740
 caccggcgca cgggtgcgggt gcgcaagggc aacacggtgc agcagttcct gaagaaggcg 1800
 ctgcaggggc tgcgcaagga cttcctggag ctgcgctccg ccggcggtga gcagctcatg 1860
 ttcacaaagg aggaacctcat cctgccgcac taccacacct tctacgactt catcatcgcc 1920
 agggcgaggg gcaagagcgg gccgctcttc agcttcgatg tgcacgatga cgtgcgcctg 1980
 ctcagcgacg ccaccatgga gaaggacgag tcgcacgcgg gcaagggtgg gctgcgcagc 2040
 tggtagaga agaacaagca catcttcccc gccagccgct gggaggccta tgaccccag 2100
 aagaagtggg acaagtacac catccgctaa caccgcctg ccagagcgga aaccgggggt 2160
 ggggggagac actcatttct agggcccatc accagtcact tgatttcgtg accttgattt 2220
 cttcccccaa atttaataaa gacagagggg tctcatgatt cacattgggt gtgctattgc 2280
 tgatgttatg ctttgggtgc ttggttggtc tttctgagt attttagtgt tgccacctgg 2340
 atttgctgca ttgctctgct gagctgtatt gaaacatga ctgggcccac tgtcagacag 2400
 aaattagaat aggaggcaca ttttttacct ggtggttatg agcatggact tgggggccac 2460
 agtgactgag tttgattccc gacacagcct cctccttgc gtgtagtttt gggtaagctt 2520
 attaaacccc catgcctcag tttggtcacc tgtaaaagga aataacaaga gcacttactt 2580
 tataagattg atgtgagtat taagtgaatt aatatttgta aaacgcttag ctcttaataa 2640
 atgtttctgt tgttattatt atggttttgg ttaatttatt taaaggactg caatgaccta 2700
 gttcagaact atttgagggc aaagggtggac ctgcccacat ctggtcccag gatcagcagt 2760
 tgccagcagg aggggggctag caaagggttg ggagcagccc ccctctagt ggcttttagct 2820
 gggttgttta gcccagaagt taggaggaca gtgagctaata gcaagtagcc tgcag 2875

<210> 4
 <211> 1217
 <212> DNA
 <213> Maus

 <220>
 <221> cDS
 <222> (137)..(1138)

 <400> 4

attcgcaaaa gcaccagaag gaagagtctt ggctcataca tcaaaagctg cagaatctgt 60

gaactgacat cagacccaga aggctaccag aaacagggac tgggcaggcc aaaaagcctt	120
gcgctgaact gcaggc atg gcg cag tac aaa ggc acc atg cgg gaa gct	169
Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala	
1 5 10	
ggc cgg gcc atg cac ctg atc aag aag cgt gag aag cag aag gag cag	217
Gly Arg Ala Met His Leu Ile Lys Lys Arg Glu Lys Gln Lys Glu Gln	
15 20 25	
atg gag gtg ctg aag cag cgc atc gca gag gag acc atc atg aag tca	265
Met Glu Val Leu Lys Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Met Lys Ser	
30 35 40	
aaa gtg gac aag aag ttc tcg gca cac tac gac gcc gtg gag gcc gag	313
Lys Val Asp Lys Lys Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu	
45 50 55	
ctg aag tcc agt acg gtg ggc ctg gtg acc ctg aat gac atg aag gcc	361
Leu Lys Ser Ser Thr Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala	
60 65 70 75	
aag cag gag gcc ctg ctg agg gag cgg gag atg cag ctg gcc aag agg	409
Lys Gln Glu Ala Leu Leu Arg Glu Arg Glu Met Gln Leu Ala Lys Arg	
80 85 90	
gag cag ctg gag caa cgc cgg ata cag ctg gag atg ctg cgc gag aag	457
Glu Gln Leu Glu Gln Arg Arg Ile Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Lys	
95 100 105	
gag cga agg cga gag cgc aag cgc aag atc tcc aac ctg tct ttc acg	505
Glu Arg Arg Arg Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ser Asn Leu Ser Phe Thr	
110 115 120	
ttg gac gag gaa gaa ggt gac caa gag gac agc cgc caa gcc gag agt	553
Leu Asp Glu Glu Glu Gly Asp Gln Glu Asp Ser Arg Gln Ala Glu Ser	
125 130 135	
gcc gag gcc cac agt gct gga gcc aag aag aac ttg ggc aag aat ccc	601
Ala Glu Ala His Ser Ala Gly Ala Lys Lys Asn Leu Gly Lys Asn Pro	
140 145 150 155	
gat gtg gac acg agc ttc ctg ccc gac cgc gag cgc gag gag gag gag	649
Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Glu Arg Glu Glu Glu Glu	
160 165 170	
aac cgg ttg cgc gag gaa ctg cgg cag gag tgg gag gcg aag cgc gag	697
Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Lys Arg Glu	
175 180 185	
aag gtg aag gcc gag gag gtg gag atc acc ttc agc tac tgg gat ggc	745
Lys Val Lys Gly Glu Glu Val Glu Ile Thr Phe Ser Tyr Trp Asp Gly	
190 195 200	
tcc ggc cac cgg cgc acg gtg cgc atg agc aag ggc agc acg gtg cag	793
Ser Gly His Arg Arg Thr Val Arg Met Ser Lys Gly Ser Thr Val Gln	
205 210 215	
cag ttc ctg aag cgg gcg ctg cag ggg ctg cgc agg gac ttc cgg gag	841
Gln Phe Leu Lys Arg Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Asp Phe Arg Glu	
220 225 230 235	
ctg cgg gca gcg gcc gtg gag cag ctc atg tac gtc aag gag gat ctc	889
Leu Arg Ala Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Tyr Val Lys Glu Asp Leu	
240 245 250	

atc ctg ccg cac tat cac acc ttc tac gac ttc atc gtg gcc aaa gcc 937
 Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Val Ala Lys Ala
 255 260 265
 cgg ggc aag agc ggc ccg ctc ttc agc ttc gac gtg cac gac gat gtg 985
 Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp Val
 270 275 280
 cgg ctg ctg agc gat gcc acg atg gag aaa gat gag tca cac gcg ggc 1033
 Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala Gly
 285 290 295
 aag gtg gtg ctt cgc agc tgg tac gag aag aac aag cac atc ttc cct 1081
 Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe Pro
 300 305 310 315
 gcc agc cgc tgg gag ccc tac gac ccc gag aag aag tgg gac agg tac 1129
 Ala Ser Arg Trp Glu Pro Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Arg Tyr
 320 325 330
 acc atc cgg tgatgccaaag tcccagtttg gggaccttac tccctaacta 1178
 Thr Ile Arg
 tcgaaaatta ataaatacag aggggtccccg taaatcgga 1217

<210> 5
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Maus

<400> 5

Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His
 1 5 10 15
 Leu Ile Lys Lys Arg Glu Lys Gln Lys Glu Gln Met Glu Val Leu Lys
 20 25 30
 Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Met Lys Ser Lys Val Asp Lys Lys
 35 40 45
 Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr
 50 55 60
 Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Lys Gln Glu Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Arg Glu Arg Glu Met Gln Leu Ala Lys Arg Glu Gln Leu Glu Gln
 85 90 95
 Arg Arg Ile Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Lys Glu Arg Arg Arg Glu
 100 105 110
 Arg Lys Arg Lys Ile Ser Asn Leu Ser Phe Thr Leu Asp Glu Glu Glu
 115 120 125
 Gly Asp Gln Glu Asp Ser Arg Gln Ala Glu Ser Ala Glu Ala His Ser
 130 135 140
 Ala Gly Ala Lys Lys Asn Leu Gly Lys Asn Pro Asp Val Asp Thr Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Pro Asp Arg Glu Arg Glu Glu Glu Glu Asn Arg Leu Arg Glu
 165 170 175
 Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Lys Arg Glu Lys Val Lys Gly Glu
 180 185 190
 Glu Val Glu Ile Thr Phe Ser Tyr Trp Asp Gly Ser Gly His Arg Arg
 195 200 205
 Thr Val Arg Met Ser Lys Gly Ser Thr Val Gln Gln Phe Leu Lys Arg
 210 215 220
 Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Asp Phe Arg Glu Leu Arg Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Glu Gln Leu Met Tyr Val Lys Glu Asp Leu Ile Leu Pro His Tyr
 245 250 255
 His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Val Ala Lys Ala Arg Gly Lys Ser Gly
 260 265 270
 Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp Val Arg Leu Leu Ser Asp
 275 280 285
 Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala Gly Lys Val Val Leu Arg
 290 295 300
 Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe Pro Ala Ser Arg Trp Glu
 305 310 315 320
 Pro Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Arg Tyr Thr Ile Arg
 325 330

<210> 6
 <211> 1232
 <212> DNA
 <213> Maus

<400> 6

ctaaaacctg aaagttattc tgatcaacca tactatacca catgcaaaat ggagtcagag	60
ctttctgtct cctctgtagc taagatcact aatgagttat tgtatgaaaa ggcaataaaa	120
tcatgctgtc tggagagtgc caatactttc agactagtgt atcacgtaaa ctcttttagta	180
acaacctaca cacaaaaatt taatctgtaa taatcaaagg.cccaagtgag caacgacagt	240
ccaggaaaac ttcatgggag gattgcattt cagttgtcag gagatcagac gctggcagca	300
ggactgcac catcagtcag tccaagtcgg cagttatata tgaccaccac ctgattggcc	360
caatctctgt cctgattggg tagagcctgc cctagcagtt ggccaatgtt ttgcatattt	420
tctgtgtcag ttagaacaaa caatatcgc aaaagcacca gaaggaagag tcttggctca	480
tacatcaaaa ggtgagggga ctggcttgaa tccagctggg gcagatgtgg gaggtacagc	540
tctttaaact cgagtaaaac caattgtgaa gggagttgaa tggttagagga aaggaatttg	600
tccattatcc tgcaagcagg ggagactaat gagccctatc ggtgacataa tatcaacatt	660
tttattgtaa tttaggaatc acaaactagc aggaaggagg aagatgcctt aaagggctat	720

gacatatgca ctaggaaaat agaaattggg gcttgttctc tctattgggt gcttttctact	780
gctgtgtcaa aagcaacctt agggaggagga aagggtttat tttgattgac tgtttgactc	840
acatttaatc ctgacagcaa gttggcagaa gcacggagtc atgttggttc tgtagtcaga	900
aagccgagca agataaggac tgcgttcac tgcctttccc tatttctcct ttctactagg	960
tctgagactc acgcccattg gcattggttaag gccatgttca agatgggttg tctttcctca	1020
gttaaatctt tctgaaaata ctcccaccag acaacatgcc aagagctgtg taccctaagg	1080
ttccaaatcc tgttagttga caagattaac cattacatga gtctcacctc cttaactcag	1140
gtctgatact gttagcttat agtactgaaa gcatactgaa ggcttcttgt ctctgctaga	1200
ttgtctgaa ctctctttt ctgccactgc ag	1232

<210> 7
 <211> 3007
 <212> DNA
 <213> Maus

<400> 7

gaattcaaac aagccagga gcagcatgag ctttaaagca gcttgcgata tcaaagaaaa	60
gaaagatgct acggaaatgg cgaggaaaca tttagacctt tggaatgaca tggaatgtca	120
gagcaaagca ctgtttggga gctatgcggt gaaatgggtgt cctcagggga aacaagaggg	180
tttgggggac cagtttggag tttggaaaga gtttgataag aggatgccag ctgttcatgg	240
gaatgagagt ccaccgagta aagaaggagc tacagaaggg ttgggaggca ctcgtagaga	300
gcggtcaatt caagttgagt ccagttaaat taagagatct ctcttttccc ttgactgaag	360
cacagagaaa acactttgta cttggcccat ctctgttgca tgcagttccc ctgatgtctt	420
gtttctcacg gcaagggagg gagagctcag agttcttttg tgtactttag cactgacaca	480
aagtgagttc cactaaaact ccatgcaaaa atcgttccta agacttgtgc taggatgaaa	540
gctccttggg atctgccaag accataacat taacgggagc ttaacctagc atcatcacc	600
tccaggtgca cgtaggggaa gctttcaagg actcttttct tttccttgct tctgtctgc	660
aggagtgggg tccaacaagg gcaggtacta tctaaaagg ccaaccccc tcatcaggag	720
acacgggttt ccacttgacc ccagcttcac tgtggctagt tctcaggaac ccaggcccag	780
gctctctcat tgctctgctc ttgcatggct gtgcatgagc agacacgggc agcatgtggt	840
ttgctctgca gaccaacctc tacatgcaaa cccctcaaaa cctactgtac taactcagta	900
gtcacatgag gctatctcag tttgaagtaa aattgctccg ttggtgacag tagttgcatt	960
tcaagtactg aggggccttc tgtgatcagt agttaccaca tcgggtcacc ctggagacag	1020
actcatcaga gaggaagctc cattgtaggc ctctggtgta gaccattaat gacgcagctg	1080
tactgggttg attctcgagc gttttgttta gttgtgtgtt gtttgttgtt tcttagctgc	1140

agaatctgtg aactgacatc agaccagaa ggctaccaga aacagggact gggcaggcca	1200
aaaagccttg cgctgaactg caggcatggc gcagtacaaa ggcaccatgc gggaagctgg	1260
ccgggccatg cacctgatca agaagcgtga gaagcagaag gagcagatgg aggtgctgaa	1320
gcagcgcac gcagaggaga ccatcatgaa gtcaaaagtg gacaagaagt tctcggcaca	1380
ctacgacgcc gtggaggccg agctgaagtc cagtacgggtg ggcttgggtga ccctgaatga	1440
catgaaggcc aagcaggagg ccctgctgag ggagcgggag atgcagctgg ccaagaggga	1500
gcagctggag caacgccgga tacagctgga gatgctgcgc gagaaggagc gaaggcgaga	1560
gcgcaagcgc aagatctcca acctgtcttt caggttggac gaggaagaag gtgaccaaga	1620
ggacagccgc caagccgaga gtgccgaggc ccacagtgtt ggagccaaga agaacttggg	1680
caagaatccc gatgtggaca cgagcttcct gcccgaccgc gagcgcgagg aggaggagaa	1740
ccggttgccg gaggaactgc ggcaggagtg ggaggcgaag cgcgagaagg tgaagggcga	1800
ggaggtggag atcaccttca gctactggga tggctccggc caccggcgca cggcgccat	1860
gagcaagggc agcacggtgc agcagttcct gaagcgggcg ctgcaggggc tgcgcaggga	1920
cttccgggag ctgcgggcag cgggcgtgga gcagctcatg tacgtcaagg aggatctcat	1980
cctgccgcac tatcacacct tctacgactt catcgtggcc aaagcccggg gcaagagcgg	2040
cccgtcttc agcttcgacg tgcacgacga tgtgcggctg ctgagcgatg ccacgatgga	2100
gaaagatgag tcacacgcgg gcaaggtggt gcttcgcagc tggtagaga agaacaagca	2160
catcttcctt gccagccgct gggagcccta cgaccccgag aagaagtggg acaggtacac	2220
catccggtga tgccaagtcc cagtttgggg accttactcc ctaactatcg aaaattaata	2280
aatacagagg gtccccgtaa atcggatgtg ttggttctgt acctggcgctc attcttcggt	2340
gtttttaatg tttctgtttg tggctccttt gtgttctgtg tgaaaaggga catgtttttg	2400
actaagtggg ttgtgcacat tagcttgggtg ggccagcaga ctgggtttga tttcttgcct	2460
caatgtctta cttgtgttgt gagcaaaatc attgcgggtca attgactcct tttccccacc	2520
tatacaagga agttacaccc cttcaggcca gcgtgaggag tgagttaata tttgtaaaca	2580
cttggaactc actcagtaaa tgcttgcgtg ttttgtgggc ctggttgcct tactaaagaa	2640
tgcttacgcg atccatctct gaaatgtcaa aaccagggtg gacctgcata tgtcattggt	2700
ttcagggtca gtcggtgcct gaaagctggt gtacagctta taagatcgga ggcgcttatt	2760
tttcttatct tcacccaaag ctcacatcta catggcaaga ttctaaatcc cgccctttaa	2820
gtttgtatat gttattcatt gttgagtgtt ttgttaattt tcaactaaaa acgtctaaaa	2880
tacagtgcac ctctttcacg gatTTTTTTta agttaccctt tttatgttaa agaccaagac	2940
ttatactttg gatctcttgc tctgtttctg gcgctgagta cttgcgccag cccaagaaca	3000
tgaattc	3007

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr)
PCT/DE99/03972	8. Dez. 1999	10. Dez. 1998
Bezeichnung der Erfindung		
Spermatogenese-Protein		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		Telefonnr.:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg		Telefaxnr.:
		Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
DE	DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
SEDLACEK, Zdenek Burgstr. 52 69121 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
CZ	DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
POUSTKA, Annemarie Werderstr. 36 60120 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
AT	DE	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreterund ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Dr. Andrea Schübler

HUBER & SCHÜSSLERPatentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

i) ☐ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)

berücksichtigt.

iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind) ausgenommen

(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

1. Änderungen nach Artikel 34

Beschreibung : Blätter ☐
 Ansprüche : Blätter ☐
 Zeichnungen : Blätter ☐

2. Begleitschreiben zu den

Änderungen nach Artikel 34 : Blätter ☐

3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 : Blätter ☐

4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 : Blätter ☐

5. Sonstige (einzeln auflühren) : Blätter ☐

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

☐ ☐

☐ ☐

☐ ☐

☐ ☐

☐ ☐

☐ ☐

☐ ☐

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ unterzeichnete gesonderte Vollmacht

4. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung

2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht

5. ☒ sonstige (einzeln auflühren):

3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift

V-Scheck

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 5.7.2000

Dr. Andrea Schübler

A. Schübler

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5. unten, finden keine Anwendung.

☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts XXX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03972	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/07/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wimmer, G Tel. Nr. +49 89 2399 7347 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

B schreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/9-9/9 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	

- 2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

Der Antrag entspricht den Bestimmungen gemäß Art. 33 PCT.

- 1) Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ;PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26. Juni 1997 (1997-06-26)

D2: TOYODA A ET AL.: 'Human HXC-26 gene' EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19. Februar 1997 (1997-02-19), XP002135680

D3: SEDLACK Z. ET AL.: 'X5L gene; XAP-5-like protein.' EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30. Juni 1999 (1999-06-30), XP002135681

Die beanspruchte Priorität der vorliegenden Ansprüche ist gültig. Dokument D3 wurde daher zur Begutachtung dieser Ansprüche nicht einbezogen.

Neuheit gemäß Art. 33(2) PCT.

- 2) Der Stand der Technik beschreibt kein Protein, welches dem der Anmeldung gemäß Fig. 1 entspricht, oder ein Protein, welches zu dem der Anmeldung 80% oder mehr homolog wäre. Ansprüche 1 und 2 werden demnach als neu angesehen.
- 3) Ebenso wird keine DNA-Sequenz gemäß beschrieben, die für ein solches Protein kodieren würde. Ansprüche 3 und 4 sind demnach ebenso neu.
- 4) Durch ihre Referenz auf einen der zuvor genannten Ansprüche, können auch die Gegenstände und Verfahren der Ansprüche 5 - 11 als neu angesehen werden.

Erfinderische Tätigkeit gemäß Art. 33(3) PCT.

- 5) Für die Bereitstellung des Proteins und der entsprechenden DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung, kann Dokument D1 als nächster Stand der Technik herangezogen werden. D1 beschreibt das Growth Hormone Releasing Hormone, und verwandte Peptide, sowie deren Rolle und Verwendung in der Beeinflussung der Spermatogenese.

Jedoch ist das Protein bzw. die Peptide von D1 zum Protein der vorliegenden Anmeldung völlig unterschiedlich; darüber hinaus bestehen in keinem Dokument zum Stand der Technik Hinweise, die den Fachmann zur Isolation des Proteins oder der DNA-Sequenz der Anmeldung leiten würden.

Für Ansprüche 1 - 11 wird deshalb ein erfinderischer Schritt gemäß Art. 33(3) PCT anerkannt.

Gewerbliche Anwendbarkeit gemäß Art. 33(4) PCT.

- 6) Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 9-11 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an (Regel 67.1(iv) PCT); es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2767 Wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03972	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1998
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ; PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Zusammenfassung; Ansprüche 5-20	1-11
A	TOYODA A ET AL.: "Human HXC-26 gene" EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19. Februar 1997 (1997-02-19), XP002135680 das ganze Dokument	1-6
P,X	SEDLACK Z. ET AL.: " X5L gene; XAP-5-like protein." EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30. Juni 1999 (1999-06-30), XP002135681 das ganze Dokument	1-6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/05/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9-11, insoweit sie sich auf einem in-vivo Verfahren beziehen, auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34472 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03972 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Dezember 1999 (08.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 56 882.7 10. Dezember 1998 (10.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEDLACEK, Zdenek [CZ/DE]; Burgstrasse 52, D-69121 Heidelberg (DE). POUSTKA, Annemarie [AT/DE]; Werderstrasse 36, D-60120 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW. ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: SPERMATOGENESIS PROTEIN (54) Bezeichnung: SPERMATOGENESE-PROTEIN (57) Abstract <p>The invention relates to a spermatogenesis protein as well as to DNA coding for and a method for producing such a protein. The invention further relates to antibodies to said protein and to the use of the DNA and the protein for studying or influencing spermatogenesis.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Spermatogenese-Protein

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Spermatogenese-Protein, eine für ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Protein gerichtete Antikörper sowie die Verwendung der DNA und des Proteins zur Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese.

Mit Spermatogenese wird die Bildung von Spermien in Säugetieren bzw. dem Menschen bezeichnet. Diese Bildung erfolgt in den Hoden. Während der Spermatogenese, insbesondere dem Pachytän-Stadium der Meiose, lagern sich die X- und Y-Chromosomen aneinander und bilden einen sog. Sexkörper aus. In diesem liegen die X- und Y-Chromosomen inaktiv vor, d.h. sie werden nicht transkribiert.

Es hat sich nun gezeigt, daß von einigen Genen der X- und Y-Chromosomen Partner-Gene existieren, die autosomal lokalisiert sind. Diese werden u.a. in den Hoden exprimiert, wodurch ihre Genprodukte in der Spermatogenese kompensatorische Funktionen hinsichtlich der entsprechenden inaktivierten Gene der X- und Y-Chromosomen haben.

Ein Eingreifen in die Spermatogenese ist nachwievor ein großes Problem. Dies liegt insbesondere daran, daß die Spermatogenese nicht im Detail verstanden ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Spermatogenese untersucht und ggfs. Wege aufgezeigt werden können, mit denen in die Spermatogenese eingegriffen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß das X-chromosomal lokalisierte Gen XAP-5 ein Partner-Gen aufweist, das autosomal lokalisiert ist und in vielen Geweben exprimiert wird. Beispielsweise ist die Expression in den Hoden zu finden, wobei sie hier besonders stark ist in der Spermatogenese, insbesondere in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Das Partner-Gen wird mit X5L bezeichnet und ist im humanen Genom auf Chromosom 6 in der Region 6pter lokalisiert. Der Anmelder hat X5L auf dem PAC-Klon LLNLP 704K12294Q13 isoliert und charakterisiert. Die DNA umfaßt eine kodierende Sequenz und ein Intron und führt zu einer etwa 1.6 kb großen cDNA. Diese kodiert für ein etwa 37 kD großes, 325 Aminosäuren umfassendes mit X5L-Protein bezeichnetes Spermatogenese-Protein (vgl. Figuren 1, 2 und 5,6). Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Mutationen im X5L-Protein die Spermatogenese beeinträchtigen können.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Spermatogenese-Protein (X5L-Protein) bereitzustellen, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und der Aminosäuresequenz von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende Aminosäuresequenz, die zu jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Die Aminosäuresequenz kann sich von jener von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Aminosäuren unterscheiden. Insbesondere kann die Aminosäuresequenz jene von Fig. 3 sein.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein X5L-Protein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA, z.B. eine cDNA,

sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 5 (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
- 10 (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

15 Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein X5L-Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein X5L-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 % zu jener von Fig. 1 aufweist. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen einzelner Basenpaare unterscheiden. Insbesondere

20 kann die DNA-Sequenz jene der Figuren 2-4 sein. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA-Sequenz hin.

25 Die DNAs der Figuren 1-4 wurden als h-X5L-c, h-X5L-g, m-X5L-c bzw. m-X5L-g bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 12550, DSM 12553, DSM 12552 bzw. DSM 12551 am 26. Nov. 1998 hinterlegt.

30 Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein X5L-Protein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E.

35 coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Ex-

pression in Insektenzellen eignet sich besonders der Bacculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so
15 daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm
20 Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein
25 gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und
30 Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der
35 Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein

Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- 5 (b) ein erfindungsgemäßes Spermatogenese-Protein (X5L-Protein)
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

10

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

15

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Spermatogenese zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein X5L-Protein nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung zwischen einem X5L-Protein und Vorgängen in der Spermatogenese hergestellt werden. Ferner kann mit einem X5L-Protein ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen.

20

25 Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Organisation und die Expression des für ein X5L-Protein kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, über in situ Hybridisierung oder durch PCR, erfolgen.

30

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen zur Inhibition oder Aktivitätssteigerung eines X5L-Proteins in Personen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper

35

kann ein X5L-Protein inhibiert werden. Andererseits kann mit einem X5L-Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge eines X5L-Proteins in Personen erhöht

werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines konstitutiven bzw. in bestimmten Geweben, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines X5L-Proteins in den Personen bzw. in bestimmten Geweben, z.B. Hoden, dieser führt.

Somit stellt die vorliegende Erfindung Mittel dar, die Spermatogenese zu untersuchen und in sie regulierend einzugreifen. Letzteres umfaßt sowohl ihre Aktivierung als auch ihre Inhibierung. Insbesondere liefert die vorliegende Erfindung Mittel, Störungen der Spermatogenese zu diagnostizieren und zu behandeln.

15

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines erfindungsgemäßen, 325 Aminosäuren umfassenden Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein). Die DNA-Sequenz ist eine humane cDNA.

20

Fig. 2 zeigt die Sequenzen einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem humanen Genom. Die cDNA von Fig. 1 beginnt am Basenpaar 739. Zwischen den Basenpaaren 828 und 1129 liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungsstelle befindet sich am Basenpaar 2658.

25

Fig. 3 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenzen eines 334 Aminosäuren umfassenden X5L-Proteins. Die DNA-Sequenz ist eine Maus cDNA.

30

Fig. 4 zeigt die Sequenz einer genomischen für ein X5L-Protein kodierenden DNA. Die DNA entstammt dem Maus Genom. Die cDNA von Fig. 3 beginnt am Basenpaar 445 von Fig. 4(A). Zwischen den Basenpaaren 492-1232 von Fig. 4(A) liegt ein Intron vor. Zwischen den

35

Basenpaaren 1-1136 von Fig. 4(B liegt ein Intron vor. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich am Basenpaar 2306 von Fig. 4(B).

5 **Fig. 5** zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben.

10 **Fig. 6** zeigt den Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden. Das Vorliegen solcher mRNA ist auf Tubuli begrenzt (Fig. 6(A)). Auf zellulärer Ebene liegt mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatoyten (Sterne) sowieder runden Spermatiden (RS) vor. Reife Spermien sind mit (MS) und Spermatogonien mit (Pfeilspitzen) gekennzeichnet. Sertoli-Zellen (Pfeile) und Leydig-Zellen (L) weisen keine mRNA eines X5L-Proteins auf.

20 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis von mRNA eines X5L-Proteins in Geweben (A)

25 RNA-Blots von humanen Geweben, wie Pankreas, Nebennierenmark, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Hoden, Thymus, Dünndarm, Magen, fötales Gehirn, fötale Lunge, fötale Leber und fötale Niere, erhalten von Clontech, werden einer Hybridisierung unterzogen. Als Hybridisierungsprobe wird eine [α^{32} P]dCTP markierte X5L-Protein spezifische DNA verwendet, die 30 zwischen den Basenpaaren 1073-1409 der DNA von Fig. 1 liegt. Die Hybridisierung erfolgt übernacht mit anschließenden Waschschritten unter üblichen Bedingungen. Zur Kontrolle werden die Blots ebenfalls mit einer radioaktiven β -actin-Probe hybridisiert (vgl. Fig. 5).

35 Es zeigt sich, daß mRNA eines X5L-Proteins in den verschiedensten Geweben exprimiert wird. Die Größe der exprimierten mRNA ist 1,7 bzw. 4,3 kb, was auf

unterschiedliche Polyadenylierungssignale der DNA von Fig. 1 zurückzuführen ist. Ferner zeigt es sich, daß die Expression von mRNA eines X5L-Proteins in Hoden am stärksten ist.

5 **(B)**

Es wird eine RNA in situ Hybridisierung an Maus-Hoden-Gewebe durchgeführt. Hierzu wird auf das Verfahren von Wilkinson, D.G. (1992), Oxford University Press, New York verwiesen. Es werden "antisense"- bzw. "sense" RNA Proben verwendet, die den
10 Basenpaaren 5-1169 der DNA von Fig. 1 entsprechen.

Es zeigt sich, daß in Hoden-Gewebe eine starke Expression von mRNA eines X5L-Proteins stattfindet. Ferner zeigt sich, daß die Expression auf Tubuli beschränkt ist. Auf zellulärer Ebene
15 zeigt sich eine Expression von mRNA eines X5L-Proteins in den Stadien der primären und sekundären Spermatocyten sowie der runden Spermatiden. Spermatogonien, reife Sertoli-Zellen und Leyding-Zellen zeigen dagegen keine Expression von mRNA eines X5L-Proteins.

20

**Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines
erfindungsgemäßen Spermatogenese-Proteins (X5L-Protein)**

Die DNA von Fig. 1 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/X5L erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner)
25 und dem erfindungsgemäßen X5L-Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/X5L wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und
30 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M
35

Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 37 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

25

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

30

- | | |
|---------|---|
| Tag 0. | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans) |
| Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 50: | 3. Immunisierung (icFA) |

35

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper

nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

- 5 Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.
- 10 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
- 15 Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet.
Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

- 5 1. Spermatogenese-Protein, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz, wobei zwischen letzterer Aminosäuresequenz und jener von Fig. 1 eine Homologie von mindestens 80 % vorliegt.
- 10 2. Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 3.
3. DNA, kodierend für das Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1, umfassend:
15 (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und für ein Spermatogenese-Protein kodiert, dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 80 %
20 zu jener von Fig. 1 aufweist, oder
(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
- 25 4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA jene von Fig. 2, Fig. 3 oder Fig. 4 ist.
5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
- 30 6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
7. Verfahren zur Herstellung eines Spermatogenese-Proteins, umfassend die Kultivierung der Transformante nach
35 Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Spermatogenese-Protein nach Anspruch 1 oder 2.

9. Verwendung des Spermatogenese-Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder einer DNA nach Anspruch 3 oder 4 zur Untersuchung bzw. Beeinflussung von Spermatogenese.
- 5 10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Beeinflussung der Spermatogenese ihre Aktivierung bzw. Inhibierung umfaßt.
11. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Untersuchung bzw. Beeinflussung der Spermatogenese eine Diagnose bzw.
10 Behandlung von Störungen der Spermatogenese umfaßt.

10	30	50	70	90
AGAGCCCGGGGCGAGTGGSCCTCTGCTCGTSGGTGGTTCTCTCGGAGGTCAgCTCCCgcGTGTCTCCGCTCGACAGGGTGCTTGGGCAGA				
110	130	150	170	
GCCCATCGGCTAGGCGCGGGCCATGGCGCAGTAACAAGGCCACCATGCGCGAGGCAGGCCGTGCCATTGCACTCTCTCAAGAAAGCGCGAAAG M A Q Y K G T M R E A G R A M H L L R K F E R				
190	210	230	250	270
GCAGCGGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCACGCCATCGGCCAGGAGACCATTCTCAAGTCAGAGTGGACAAGAGGTTCTCGGCGCATTAA Q R E Q M E V L K Q R I A E E T L L K S Q V D K R F S A H Y				
290	310	330	350	
CGACGCCGTGGAGGCCGAGCTGAAGTCCAAGCACGGTGGGCCCTGGTGACCTGAACGACATGAAGGCCCGGACAGGAGGCCCTGGTCAGGGA D A V E A E L K S S T V G L V T L N D M K A R Q E A L V R E				
370	390	410	430	450
GCGCGAGCGGCAGCTGGCCAGCGCCAGCACCTCGAGGAGCAGCGGCTGCAGCAGGAGCGGCAGCGGCAGCAGGAGCAGCGGCGCGGAGCGG R E R Q L A K R Q H L E E Q R L Q Q E R Q R E Q E Q R R E R				
470	490	510	530	
CAAGCGTAAGATCTCTCTGCTCTCTTGCCTACTAGACGACCTCGATGACCAAGGCCGACGCGGCGGCGAGGCCAGGCGCGCGGCGAACCCTGGG K R K I S C L S F A L D D L D D Q A D A A E A R R A G N L G				
550	570	590	610	630
CAAGAACCCCGCAGCTGGACACCAGCTTCCTGCCAGACCGGACCGCGAGGAGGAGSAGAACCGGCTCCGAGAGGAGCTGCGCCCAAGAGTG K N P D V D T E F L P D R D R E E E E N R L R E E L R Q E W				
650	670	690	710	
GGAGGCGCAGCGCGAGAAAGTGAAGGACCAGGAGATGGAGGTCACTTCAGCTACTGGGACGGCTCGGGCCACCGCGGCACGGCTGCGGGT E A Q K E K V K D E E M E V T F S Y W D G S G H R R T V R V				
730	750	770	790	810
GCCGAAGGGCAACCGGTCAGCAGTTCTCTGAAGAAGGCCGTCGAGGGGCTGCGCAAGGACTCTCTGGAGCTGCGCTCCGCCCGCGCTGGA R K G N T V Q Q F L K K A L Q G L R K D F L E L R S A G V E				
830	850	870	890	
GCAGCTCATCTTCATCAAGGAGGACCTCATCTGCCGCACTACCAACCTTCTACGACTTCATCATCGCCAGGGCGAGGGGCCAAGAGCGG Q L M F I K E D L I L P H Y H T F Y D F I I A R A R G K S G				
910	930	950	970	990
GCCGCTCTTCAGCTTCGATGTGCACCATGACCTGCGGCTGCTCAGCGACGCCACCATGGAGAGGAGCAGAGTCGCGCGGGCAAGGTGGT P L F S F D V H D D V R L L S D A T M E K D E S H A G X V V				
1010	1030	1050	1070	
GCTGCGCAGCTGGTACGAGAAGAACAAGCACATCTCCCCGCCAGCGGCTGGGAGGCGCTAGACCCCGAGAAGAAGTGGGACAAGTACAC L R S W Y E K N K H I F P A S R W E A Y D P E K K W D K Y T				
1090	1110	1130	1150	1170
CATCCGCTAAACACCCGCTGCCAGAGCGGAACCGGGGGTGGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCATCACAGTCACCTTGATTTGCTG I R				
1190	1210	1230	1250	
ACCTTGATTCTCTCCCCCAAATTAATAAAGACAGAGGGTTCTCATGATTACATTGGTTGTGCTATTGCTGATGTTATGCTTTGGTTGC TTGGTTGGTCTTTCTGAGTATTTTAGTGTTGCCACCTGGATTGTCTGCATTGCTCTGCTGAGCTGTATTGAAACCATGACTGGGCCCCAC				
1270	1290	1310	1330	1350
TGTCAGACAGAAATTAGAAATAGGAGGCACATTTTTACCTGGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCCC TGTCAGACAGAAATTAGAAATAGGAGGCACATTTTTACCTGGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCCC				
1450	1470	1490	1510	1530
GACACAGCCTCTCTCTGTGTAGTTTGGGTAAGCTTATTAAACCCCATGCCCTCAGTTTGGTCACCTGTAAAAGGAAATAACAAGA				
1550	1570	1590	1610	
GCACTTACTTTATAAGACTGATGTGAGTATTAAGTGAATTAACATTGTAAAAACGCTTAGCTCTTAATAAATGTTTCTGTTGTTATTA				

Fig. 1

2/9

10 30 50 70 90
 GAAACGGTCAACGAAACATGAACTGGTCTGCGCTGCTTGGAGAGTTACAGTGGAACTGGCATTTAGAGGGCTCACAGTAAAGACACTG
 110 130 150 170
 CTACACTTTAACTCAGTGTCCATGGTTATTAGAGCTTAGAACCCCGGGGAAACTGCTGTATAGAAAGAGGTCAAAACAAGCTGAGTGCAGG
 190 210 230 250 270
 TTTTGTACGAAACTGGGGGCGAGTAGGGTTCTATTATCAAAGAATGGTTGTGTTGGGGCCATTAAGAAAGAATTACAGGCGAGTGTGCG
 290 310 330 350
 CAGGTAAATGTTACAGAGACGCTCACAGCGGGTAGCATCAGAGCGGGAGGAGGAGGCTTGGAGAGCAGGGCCGTGTCAGAGGCTCTCTG
 370 390 410 430 450
 GGTGGCCACAGCAGCTTGCCTCTGCGCCCACTTGGCTTCTGCTGTTACAGCTGGGCACGAGAAAGCTCAGCAGCCACGACAGCGGTG
 470 490 510 530
 GGGGCCCCCTCTGCCCCACAGCTGAAACAGAGAGCCCCCGCCAGCCACGGCTGGGCAAGGCGCAGAGAGCGCTCTCTCAGGATTCCTCCCGG
 550 570 590 610 630
 CGCTGGCCCCCGCCACAGGAGCAGCCGCCCTACAGGAGCGCGGAGCTCTTCCAGGGCGCCGCTCCCCCGCAGGGGGGATCCACCTCC
 650 670 690 710
 ACTTCCCTGTTTCCGACGCGCCCTACAGGAGCGTGGCACTCTCTCAGGGCGCCGCTCCCGCCAGGGGGGCGACCGGCTCCATTCCT
 730 750 770 790 810
 GTGTCTACAGGCTGTCCGAGAGCGCCCGGGCGAGTGGGGCTCTGCTCGTGGCTGGTCTCTCTGAGAGTCAAGTCTCCCGCTGTCTCCGCTG
 830 850 870 890
 ACAGGTGCTTGGGCAAGTAAAGGTCCGCTCAGTAGCCCAAGCTCTCTCTGATGAGAGTCCGCAATTCAAGCGTCCGCTCAGGCAATGGC
 910 930 950 970 990
 AGCCACCCGTTACGTGGGCGCTTCCGATTTGATTTATAGAGTCAAAATAAATGCTGGAAATGCTGCTGCTGCTGACACTGTCTAGGTTG
 1010 1030 1050 1070
 GTGGTTACCTAGCAGGTCCGGCCAGCCCCGTAACGTTCCATCACTGCGGAAAGCCCTGTGAGGAGGGCGCAGAGCTGAGCAATTCCTCCG
 1090 1110 1130 1150 1170
 CGTTGCGTGGGCCCCCTCTACCTGCGGCTTTTCTCTCTTCTGCGAGAGCCCATCGGCTAGGCGCGGGCCATGGCGAGTACAGGGC
 1190 1210 1230 1250
 ACCATGCGCGAGGAGGGCGTCCCATGCACTCTCTCAAGAAAGCGGAAAGCGAGCGGGAGCAGATGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCC
 1270 1290 1310 1330 1350
 GAGGAGACCATCTCAAGTCCGAGGTGGACAGAGGTTCTCCGCGCAATTACGACCGCTGGAGGGCTGAGCTGAAGTCCAGCACGCTGGGC
 1370 1390 1410 1430
 CTGGTGACCTGAACGACATGAAGGCGCGGCGAGGAGGCTTGGTCAAGGAGCGCGAGCGGCAAGCTGGCCAAAGCGCCAGCACTTGAGGAG
 1450 1470 1490 1510 1530
 CAGCGGCTGACGAGGAGCGGCGAGCGGAGCGAGGAGCGGCGGAGCGGCAAGCGTAAGATCTCTGCTGCTGCTTTGCACTAGACGAC
 1550 1570 1590 1610
 CTCGATGACCAGGCGGAGCGCGGCGAGGCGGCGGCGGAAACCTGGGCAAGAACCTCGACCTGACACAGCTTCTGCTGACAGCGC
 1630 1650 1670 1690 1710
 GACCCTGAGGAGGAGGAGAAACGGGCTCCGAGAGGAGCTGCGGCAAGAGTGGAGGCGCGAGCGGAGAAAGTGAAGGACGAGGAGATGGAG
 1730 1750 1770 1790
 GTCACCTTCAAGTACTGGGACGGCTCGGGCGACCGCGGCACTGCTGGGCTGGGCAAGGCGAACACGCTGACGAGTTCTTGAAGAAGCGC
 1810 1830 1850 1870 1890
 CTGACGCGGCTCCGCAAGCACTTCTGAGGCTGCGCTCCGCGCGCTGGAGCAGCTCATGTTCTATCAAGGAGGACCTCATCTGCGCGAC
 1910 1930 1950 1970
 TACCACACCTTCTACGACTTCATCATCGGCGAGGCGGAGGCGGAGAGCGGCGCTCTTCAAGCTTCGATGTGACGATGACGTCGCGCTG
 1990 2010 2030 2050 2070
 CTCAGCGACGCCACCATGGAGAAAGGACGAGTCCACCGCGGCAAGGTGGTGTCTGCGAGCTGGTACGAGAAAGCAAGCACTCTTCTCCG

Fig. 2

2090 2110 2130 2150
GCCAGCCGCTGGGAGGCGCTATGACCCCGAGAAAGTGGGACAAAGTACACCATCCGCTAAACACCCGCTGCCAGAGCGGAAACCGGGGT
2170 2190 2210 2230 2250
GGGGGGAGACACTCATTTCTAGGCCCCATCCCACTCACTTGATTTCCTGACCTTGATTCTTCCGCCAAATTTAAATAAGACAGAGGGT
2270 2290 2310 2330
TCTCATGATTCACATTGGTTGTGCTATTGCTGATGCTATGCTTTGGTTGCTTGCTTGGTCTTTCTGAGTATTTAGTGTTCGCACTCTGG
2350 2370 2390 2410 2430
ATTTGCTGCATTGCTCTGCTGAGCTGTATTTGAACCATGACTGGCCCCACTGTCAAGACAGAAATAGAATAGGAGGCGACATTTTCTACCT
2450 2470 2490 2510
GGTGGTTATGAGCATGGACTTGGGGCCACAGTGACTGAGTTTGATTCCCGACACAGCCCTCTCCTTGGTGTGTAGTTTGGGTAGCTT
2530 2550 2570 2590 2610
ATTAAACCCCATGCCCTCAGTTTGGTCACCTGTAAAAGGAAATAACAAGAGCACTTACTTTATAAGATTGATGTGATTAAGTGAATT
2630 2650 2670 2690
AATATTTGTAAAACGCTTAGCTCTTAATAAAGTTCCTGTTGTATTATTTATGTTTTGTTAATTTATTAAAGGACTGCCAATGACCTA
2710 2730 2750 2770 2790
GTTTCAGAACTATTTGAGGGCAAGGTGGACCTGCCCATCACTGGTCCCAAGGATCAGCAGTTGCCAGCAGGAGGGGCTAGCAAGCTTGG
2810 2830 2850 2870
GGAGCAGCCCCCTCTAGTGGGCTTTAGCTGGGTGTTTAGCCCAAGTTAGGAGGACAGTGAGCTAATGCAGTACCTGCGAG

Fig. 2 (Fortsetzung)

4/9

10 30 50 70 90
 ATTCGCAAAAGCACCAGAAGGAAGAGTCTTGGCTCATACATCAAAAGCTGCAGAACTCTGTGAAGTACATCAGACCCAGAGGCTACCA
 110 130 150 170
 AAACAGGGAAGTGGGCAGGCCAAAAGCCTTGGCTGAAGTGCAGGCATGGCGCAGTACAAGGCACCATGCGGGAAGCTGGCCGGGCCAT
 H A Q Y K G T M R E A G R A M
 190 210 230 250 270
 GCACCTGATCAAGAAGCGTGAGAGCAGAAAGGAGCAGATGGAGGTGCTGAAGCAGCGCATCGCAGAGGAGACCATCATGAAGTCAAAAGT
 H L I R K R E K Q K E Q M E V L K Q R - A E E T I M R S R V
 290 310 330 350
 GGACAAGAAGTTCCTGGGCACACTACGACGCGCTGGAGGCCGAGCTGAAGTCCAGTACCGTGGGCTGGTGACCTGAATGACATGAAGGC
 D K K F S A H Y D A V E A E L K S E T V G L V T L N D M K A
 370 390 410 430 450
 CAAGCAGGAGGCCCTGCTGAGGGAGCGGAGATGCAGCTGGCCAAGAGGGAGCAGCTGGAGCAACGCCGATACAGCTGGAGATGCTGCC
 K Q E A L L R E R E M Q L A K R E Q L E Q R R - Q L E M L R
 470 490 510 530
 CGAGAAGGAGCGAAGGCGAGAGCGCAAGCGCAAGATCTCCAACTGTCTTTCACCTTGGACGAGGAAGAAGGTGACCAAGAGGACAGCCG
 E K E R R R E R K R K - S N L S F T L D E E E G D Q E D S R
 550 570 590 610 630
 CCAAGCCGAGAGTGCCGAGGCCCAAGTGTGGAGCCAAAGAAGACTTGGGCAAGAATCCCGATGTGGACACGAGCTTCTTCCCGCAGCC
 Q A E S A E A H S A G A K K N L G K N P E V D T S F L P D R
 650 670 690 710
 CGAGCCGAGGAGGAGGAGAACCCGTTGCCGAGGAAGTCCGCGAGGAGTGGGAGGCCAAGCGCGAGAAGGTGAAGGGCGAGGAGGTGA
 E R E E E E N R L R E E L R Q E W E A K R E K V K G E E V E
 730 750 770 790 810
 GATCACCTTCAAGTACTGGGATGGCTCCGGCCACCGGCGACGGTGGCGATGAGCAAGGGCAGCACGGTGCAGCAGTCTCTGAAGCGGGC
 I T F S Y W D G S G H R R T V R M S K G S T V Q Q F L K R A
 830 850 870 890
 GCTGCAGGGGCTGGCGAGGGACTTCCGGGAGCTGCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACCTCAAGGAGGATCTCATCTGCCGCA
 L Q G L R R D F R E L R A A G V E Q L M Y V K E D L I L F H
 910 930 950 970 990
 CTATCACACCTTCTACGACTTCATCTGTGGCCAAAGCCCCGGGCAAGAGCGGCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGACGATGTGCGGCT
 Y H T F Y D F I V A K A K G R S G F L F S F D V H D D V R L
 1010 1030 1050 1070
 GCTGAGCGATGCCACGATGGAGAAAGATGAGTCACACGCGGGCAAGGTGGTGGTCTTCCAGCTGGTACGAGAAGAACAAGCACATCTTCCC
 L S D A T M E K D E S H A G K V V L R S W Y E K N K H I F P
 1090 1110 1130 1150 1170
 TGCCAGCCGCTGGGAGCTCTACGACCCCGAAGAAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCAGTTTGGGGACCTTACTC
 A S R W E P Y D P E K K W D R Y T I R
 1190 1210
 CCTAACTATCGAAAATTAAATAATACAGAGGGTCCCCGTAAATCGGA

Fig. 3

5/9

```

      10              30              50              70              90
CTAAAACCTGAAAGTTATTCTGATCAACCATACTATACCACATGCAAAATGGAGTCAGAGCTTTCTGTCCTCTGTAGCTAAGATCACT
      110              130              150              170
AATGAGTTATTGTATGAAAAGGCAATAAAATCATGCTGTCTGGAGAGTGCCTAATCTTCAGACTAGTGTATCAGCTAAACTCTTTAGTA
      190              210              230              250              270
ACAACCTACACACAAAAATTTAATCTGTAATAATCAAAGGCCCAAGTGAGCAACGACAGTCCAGGAAAACTTCATGGGAGGATTGCATTT
      290              310              330              350
CAGTTGTCAGGAGATCAGACGCTGGCAGCAGGACTGCATCCATCAGTCAGTCCAAAGTCGGCAGTTATACATGACCACCACTGATTGGCC
      370              390              410              430              450
CAATCTCTGTCCTGATTGGCTAGAGCCTGCCCTAGCAGTGGGCCAATGTTTGCATATTTCTGTGTCAGTTAGAACAAAACAATATTCGC
      470              490              510              530
AAAAGCACCAGAAAGGAAGGTCTTGGCTCATACATCAAAGGTGAGGGGACTGGCTTGAATCCAGCTGGGGCAGATGTSGGAGGTACAGC
      550              570              590              610              630
TCTTTAAACTCGAGTAAAACCAATTGTGAAGGGAGTTGAATGTTAGAGGAAAGGAATTGTCCATTATCCTGCAAGCAGGGGAGACTAACT
      550              670              690              710
GAGCCCTATCGGTGACATAATCAACATTTTATTGTAATTTAGGAATCACAACCTAGCAGGAAGGAGGAAGATGCCTTAAAGGGCTAT
      730              750              770              790              810
GACATATGCCTAGGAAAAAGAAAATGGGGCTTGTCTCTTATTGTTGCTTTTCACTGCTGTCTCAAAGCAACCTAAGGAGGAGGA
      830              850              870              890
AAGGGTTTATTTTGATTGACTGTCTGACTCACATTTAATCCTGACAGCAAGTTGGCAGAAAGCACGGAGTCATGTTGTTTCTGTAGTCAG
      910              930              950              970              990
AAGCCGAGCAAGATAAGGACTGCGTTTATCTGCCCTTCCCTATTCTCTTCTACTAGGTCTGAGACTCACGCCCCATGGGCATGTTAAG
      1010              1030              1050              1070
GCCATGTTCAAGATGGTTTGTCTTCCCTCAGTTAAATCTTTCTGAAAATACTCCCAACCAACAACATGCCAAGAGCTGTGTATCCTAAGG
      1090              1110              1130              1150              1170
TTCCAAATCCTGTTAGTTGACAAGATTAAACATTACATGAGTCTCACCTCCTTAACTCAGGTCTGATACGTGTTAGCTTATAGTACTGAA
      1190              1210              1230
GCATACTGAAGGCTTCTTGTCTCTGCTAGATTGCTCTGAACCTCCTCTTTCTGCCACTGCAG

```

Fig. 4 (A)

Fig. 4 (B)

1910 1930 1950 1970
 GAAGCGGGCGCTGCAGGGGCTGCGCAGGGACTTCCGGGAGCTGCGGGCAGCGGGCGTGGAGCAGCTCATGTACGTCAAGGAGGATCTCAT
 1990 2010 2030 2050 2070
 CCTGCCGCACTATCACACCTTCTACGACTTCATCGTGGCCAAAGCCCGGGGGCAAGAGCGGCCCGCTCTTCAGCTTCGACGTGCACGACGA
 2090 2110 2130 2150
 TGTGCGGCTGCTGAGCGATGCCACGATGGAGAAAGATGAGTCACACGCGGGCAAGGTGGTGCCTTCGCGAGTGTGTACGAGAGAACAGCA
 2170 2190 2210 2230 2250
 CATCTTCCCTGCCAGCGCTGGGAGCCCTACGACCCCGAGAAAGAGTGGGACAGGTACACCATCCGGTGATGCCAAGTCCCACTTTGGGG
 2270 2290 2310 2330
 ACCTTACTCCCTAACTATCGAAAAATAATAAATACAGAGGGTCCCCGTAAATCGGATGTGTGGTTCGTACCTGGCGTCACTTCTCGGT
 2350 2370 2390 2410 2430
 GTTTTAAATGTTCTGTGTGTGGCTCCCTTGTGTCTGTGTGAAAGGGACATGTTTTGACTAAGTGGGTGTGTGCACATAGCTTGGTG
 2450 2470 2490 2510
 GGCCAGCAGACTGGGTTTGATTTCTTGTCTCAATGCTTACTTGTGTGTGTGAGCAAAATCATTCGGGTCAATTGACTCCCTTTCCCCACC
 2530 2550 2570 2590 2610
 TATACAAGGAAGTTACACCCCTTCAGGCCAGCGTGAGGAGTGAGTTAATATTTCTAAACACTTGGAACTCACTCAGTAAATGCCCTGCTGT
 2630 2650 2670 2690
 TTTTGTGGGCTGGTGTCTTACTAAAGAATGCCATCGCGATCCATCTCTGAAATGTCAAACCAGGGTACACCTGCATATGTCAATTGGT
 2710 2730 2750 2770 2790
 TTCAGGTCAGTCCGTGCCCTGAAAGCTGGTGTACAGCTTATAAGATCGGAGGCGCTTATTTTCTTATCTTCACCCAAAGCTCACATCTA
 2810 2830 2850 2870
 CATGGCAAGATTTCTAAATCCCGCCCTTTAAGTTGTATATGTTATTCATGTGTGAGTGTTTTGTAAATTTTCACTTAAACGCTCTAAAA
 2890 2910 2930 2950 2970
 TACAGTGCATCTCTTTACCGGATTTTTTAAGTTACCCCTTTTATGTAAAGACCAAGACTTATACTTTGGATCTCTGCTCTGTTTTCTG
 2990
 GCGCTGAGTACTTSCGCCAGCCCCAAGAACATGAATTC

Fig. 4 (B) Fortsetzung)

8/9

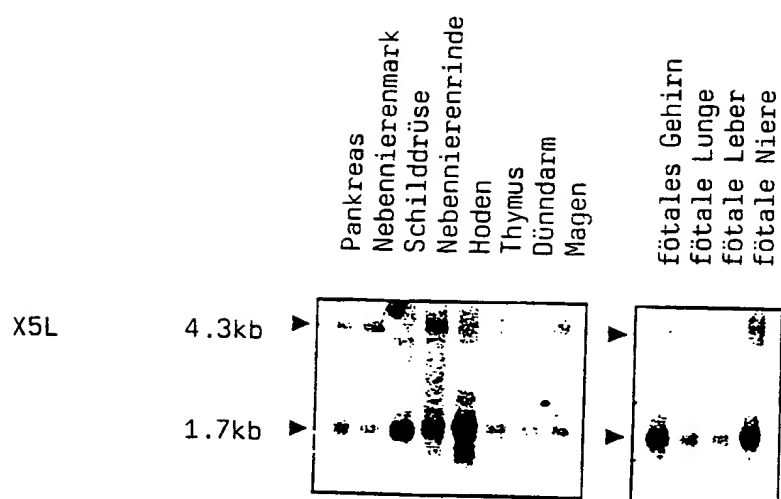


Fig. 5

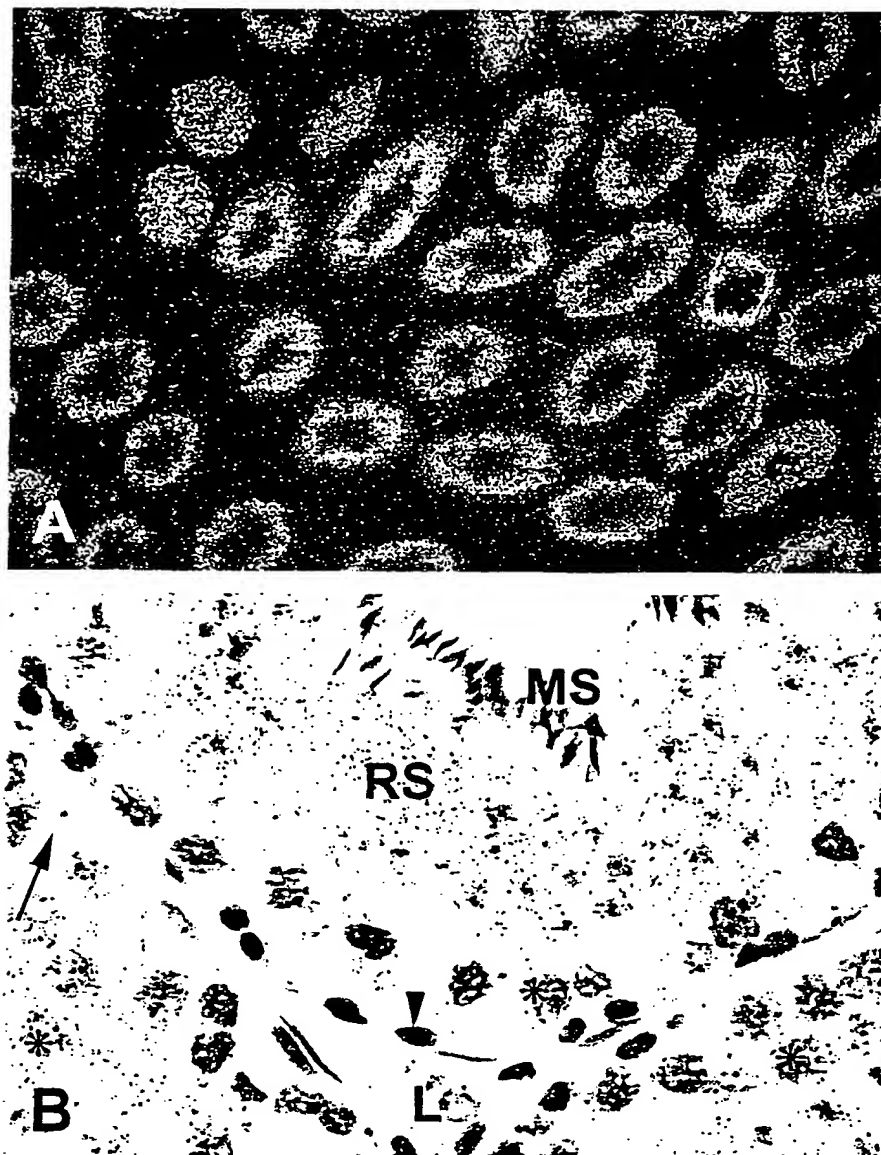


Fig. 6

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Spermatogenese-Protein

<130> K 2767

<140> PCT/DE99/03972

<141> 1999-12-08

<150> DE 198 56 882.7

<151> 1998-12-10

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 1618

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (113)..(1087)

<400> 1

```

agagccccggg gcgagtgggc ctctgctcgt gggtgggttct cgtggaggtc agtccccgcg      60
tgtctccgct cgacaggggtg cttgggcaga gcccatcggg taggcgcggg cc atg      115
                                   Met
                                   1

gcg cag tac aag ggc acc atg cgc gag gca ggc cgt gcc atg cac ctc      163
Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His Leu
                                   5                                   10                                   15

ctc aag aag cgc gaa agg cag cgg gag cag atg gag gtg ctg aag cag      211
Leu Lys Lys Arg Glu Arg Gln Arg Glu Gln Met Glu Val Leu Lys Gln
                                   20                                   25                                   30

cgc atc gcc gag gag acc atc ctc aag tcg cag gtg gac aag agg ttc      259
Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ser Gln Val Asp Lys Arg Phe
                                   35                                   40                                   45

tcg gcg cat tac gac gcc gtg gag gcc gag ctg aag tcc agc acg gtg      307
Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr Val
                                   50                                   55                                   60                                   65

ggc ctg gtg acc ctg aac gac atg aag gcc cgg cag gag gcc ctg gtc      355
Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Arg Gln Glu Ala Leu Val
                                   70                                   75                                   80

agg gag cgc gag cgg cag ctg gcc aag cgc cag cac ctg gag gag cag      403
Arg Glu Arg Glu Arg Gln Leu Ala Lys Arg Gln His Leu Glu Glu Gln
                                   85                                   90                                   95

```


cgg ctg cag cag gag cgg cag cgg gag cag gag cag cgg cgc gag cgc	451
Arg Leu Gln Gln Glu Arg Gln Arg Glu Gln Glu Gln Arg Arg Glu Arg	
100 105 110	
aag cgt aag atc tcc tgc ctg tcc ttt gca cta gac gac ctc gat gac	499
Lys Arg Lys Ile Ser Cys Leu Ser Phe Ala Leu Asp Asp Leu Asp Asp	
115 120 125	
cag gcc gac gcg gcc gag gcc agg cgc gcc gga aac ctg ggc aag aac	547
Gln Ala Asp Ala Ala Glu Ala Arg Arg Ala Gly Asn Leu Gly Lys Asn	
130 135 140 145	
ccc gac gtg gac acc agc ttc ctg cca gac cgc gac cgc gag gag gag	595
Pro Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Asp Arg Glu Glu Glu	
150 155 160	
gag aac cgg ctc cga gag gag ctg cgc caa gag tgg gag gcg cag cgc	643
Glu Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Gln Arg	
165 170 175	
gag aaa gtg aag gac gag gag atg gag gtc acc ttc agc tac tgg gac	691
Glu Lys Val Lys Asp Glu Glu Met Glu Val Thr Phe Ser Tyr Trp Asp	
180 185 190	
ggc tcg ggc cac cgg cgc acg gtg cgg gtg cgc aag ggc aac acg gtg	739
Gly Ser Gly His Arg Arg Thr Val Arg Val Arg Lys Gly Asn Thr Val	
195 200 205	
cag cag ttc ctg aag aag gcg ctg cag ggg ctg cgc aag gac ttc ctg	787
Gln Gln Phe Leu Lys Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Lys Asp Phe Leu	
210 215 220 225	
gag ctg cgc tcc gcc ggc gtg gag cag ctc atg ttc atc aag gag gac	835
Glu Leu Arg Ser Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Phe Ile Lys Glu Asp	
230 235 240	
ctc atc ctg ccg cac tac cac acc ttc tac gac ttc atc atc gcc agg	883
Leu Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Ile Ala Arg	
245 250 255	
gcg agg ggc aag agc ggg ccg ctc ttc agc ttc gat gtg cac gat gac	931
Ala Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp	
260 265 270	
gtg cgc ctg ctc agc gac gcc acc atg gag aag gac gag tcg cac gcg	979
Val Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala	
275 280 285	
ggc aag gtg gtg ctg cgc agc tgg tac gag aag aac aag cac atc ttc	1027
Gly Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe	
290 295 300 305	
ccc gcc agc cgc tgg gag gcc tat gac ccc gag aag aag tgg gac aag	1075
Pro Ala Ser Arg Trp Glu Ala Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Lys	
310 315 320	
tac acc atc cgc taacacccgc ctgccagagc ggaaaccggg ggtgggggga	1127
Tyr Thr Ile Arg	
325	
gacactcatt tetagggccc atcaccagtc acttgatttc gtgacctga tttcttcccc	1187
caaatttaat aaagacagag ggtttctcatg attcacattg gttgtgctat tgctgatgtt	1247
atgcttttgggt tgcttggttg gtctttttctg agtatttttag tgttgccacc tggatttgct	1307
gcattgctct gctgagctgt attgaaacca tgactgggcc cactgtcaga cagaaattag	1367


```

aataggaggc acatttttta cctgggtggtt atgagcatgg acttggggggc cacagtgact      1427
gagtttgatt cccgacacag cctcctcctt gctgtgtagt tttgggtaag cttattaaac      1487
ccccatgcct cagtttggtc acctgtaaaa ggaaataaca agagcactta ctttataaga      1547
ttgatgtgag tattaagtga attaatatatt gtaaaacgct tagctcttaa taaatgtttc      1607
tggtgttatt a                                1618

```

<210> 2
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 2

```

Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His
 1          5          10          15
Leu Leu Lys Lys Arg Glu Arg Gln Arg Glu Gln Met Glu Val Leu Lys
      20          25          30
Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ser Gln Val Asp Lys Arg
      35          40          45
Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr
      50          55          60
Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Arg Gln Glu Ala Leu
      65          70          75          80
Val Arg Glu Arg Glu Arg Gln Leu Ala Lys Arg Gln His Leu Glu Glu
      85          90          95
Gln Arg Leu Gln Gln Glu Arg Gln Arg Glu Gln Glu Gln Arg Arg Glu
      100          105          110
Arg Lys Arg Lys Ile Ser Cys Leu Ser Phe Ala Leu Asp Asp Leu Asp
      115          120          125
Asp Gln Ala Asp Ala Ala Glu Ala Arg Arg Ala Gly Asn Leu Gly Lys
      130          135          140
Asn Pro Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Asp Arg Glu Glu
      145          150          155          160
Glu Glu Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Gln
      165          170          175
Arg Glu Lys Val Lys Asp Glu Glu Met Glu Val Thr Phe Ser Tyr Trp
      180          185          190
Asp Gly Ser Gly His Arg Arg Thr Val Arg Val Arg Lys Gly Asn Thr
      195          200          205
Val Gln Gln Phe Leu Lys Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Lys Asp Phe
      210          215          220
Leu Glu Leu Arg Ser Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Phe Ile Lys Glu
      225          230          235          240
Asp Leu Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Ile Ala
      245          250          255

```


Arg Ala Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp
 260 265 270
 Asp Val Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His
 275 280 285
 Ala Gly Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile
 290 295 300
 Phe Pro Ala Ser Arg Trp Glu Ala Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp
 305 310 315 320
 Lys Tyr Thr Ile Arg
 325

<210> 3
 <211> 2875
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 3

```

gaaacggtca cgaaacatga actggtctgc cctgctcttg gagagttaca gtggaaactg      60
gcatgttaga ggctcacagt aaagacactg ctacacttta actcagtgtc ccatggttat      120
tagagcttag aaccgggggg aaactgctgt atagaagagg tcaaacaagc tgagtgcagg      180
ttttgtcacg aaactggggg gcgagtaggg ttctattatc aaagaatggg tgtgttgggg      240
ccataagaaa gaattacagg cagtgggtgcg caggtaatgt tcacgagacg ccacagcggg      300
gtagcatcag aggcgggagg aggaggggtg gagagcaggg ccgtgttgca aggctctctg      360
ggtggccaca gcagcttgcg ctgcgccac attgcttctg cgtgtttaca gctgggcacg      420
agaaggctca gcacgcacgc acagcaggtg ggggcccgcc ctgccacag cgtgaaaaca      480
ggagccccgg ccagccacgg ctgggcaggg ccagaagcgc ctctccagg atcctccccg      540
cgctggcccc cccacagga gcaccgcccc taccaggagc cgggagctct tcccagggcc      600
cgctcccccg ccagggggcg atccacctcc acttctctgt tccgcagccg ccctaccagg      660
agcctggcac tctctcagg gcccgctcc ccgccagggg gcgcaccgcc tccacttctt      720
gtgtccacgg ctgtcgcgag agcccggggc gagtgggctt ctgctcgtgg gtggttctctg      780
tggaggtcag ctcccgcgtg tctccgctcg acaggggtgct tgggcaggta agggctccgct      840
cagtagccca accctctctg tatgcagctc cccaaattca gcgctgcgct caggcatggc      900
agccaccctg tacgtggggc cgttcgcatt tgcatttatt gaggtcaaataaaaatgctgg      960
aaattgggtg ctggtgacac tgtcaggttg gtggttaccc tagcaggtcg gccagcccc      1020
tgaacgcttc catcactgcc gaaagccctg tgaggaggcg cagagctgag cattccccgc      1080
cgttgcgtgg gccccctctt acctgccgcg ttttctctct ttgctgcaga gcccatcggg      1140
taggcgcggg ccatggcgca gtacaagggc accatgcgcg aggcaggccg tgccatgcac      1200
ctctcaaga agcgcgaaaag gcagcgggag cagatggagg tgctgaagca gcgcatcgcc      1260
gaggagacca tcctcaagtc gcaggtggac aagaggttct cggcgcata cgacgccgtg      1320
  
```


gaggccgagc tgaagtccag cacggtgggc ctggtgaccc tgaacgacat gaaggccccg 1380
 caggaggccc tggtcagggg gcgcgagcgg cagctggcca agcgccagca cctggaggag 1440
 cagcggctgc agcaggagcg gcagcgggag caggagcagc ggcgcgagcg caagcgtaag 1500
 atctcctgcc tgtcctttgc actagacgac ctcgatgacc aggcgcgacg gcccgaggcc 1560
 aggcgcgccc gaaacctggg caagaacccc gacgtggaca ccagcttcct gccagaccgc 1620
 gaccgcgagg aggaggagaa ccggctccga gaggagctgc gccaaagagt ggaggcgagc 1680
 cgcgagaaag tgaaggacga ggagatggag gtcaccttca gctactggga cggctcgggc 1740
 caccggcgca cggtgccggg gcgcaagggc aacacggtgc agcagttcct gaagaaggcg 1800
 ctgcaggggc tgcgcaagga cttcctggag ctgcgctccg cggcggtgga gcagctcatg 1860
 ttcataaagg aggacctcat cctgccgcac taccacacct tctacgactt catcatcgcc 1920
 agggcgaggg gcaagagcgg gccgctcttc agcttcgatg tgcacgatga cgtgcgcctg 1980
 ctcagcgacg ccaccatgga gaaggacgag tcgcacgcgg gcaaggtggg gctgcgcagc 2040
 cggtagcaga agaacaagca catcttcccc gccagccgct gggaggccta tgacccccgag 2100
 aagaagtggg acaagtacac catccgctaa caccgcctg ccagagcggg aaccgggggt 2160
 ggggggagac actcatcttct agggcccatc accagtcact tgatttcgtg accttgattt 2220
 cttcccccaa atttaataaa gacagagggt tctcatgatt cacattgggt gtgctattgc 2280
 tgatgttatg ctttggttgc ttggttggtc tttctgagt attttagtgt tgccacctgg 2340
 atttgctgca ttgctctgct gagctgtatt gaaaccatga ctgggcccac tgtcagacag 2400
 aaattagaat aggaggcaca ttttttacct ggtggttatg agcatggact tgggggccac 2460
 agtgactgag tttgattccc gacacagcct cctccttgct gtgtagtttt gggtaagctt 2520
 attaaacccc catgcctcag tttggtcacc tgtaaaagga aataacaaga gcacttactt 2580
 tataagattg atgtgagtat taagtgaatt aatatttgta aaacgcttag ctcttaataa 2640
 atgtttctgt tgttattatt atggttttgg ttaatttatt taaaggactg caatgacctt 2700
 gttcagaact atttgagggc aaagggtggc ctgcccata caaggtcccag gatcagcagt 2760
 tgccagcagg agggggctag caaagggttg ggagcagccc ccctctagtg ggcttttagct 2820
 gggttgttta gcccagaagt taggaggaca gtgagctaata gcaagtagcc tgcag 2875

<210> 4

<211> 1217

<212> DNA

<213> Maus

<220>

<221> cDS

<222> (137) .. (1138)

<400> 4

atctgcaaaa gcaccagaag gaagagtctt ggctcatata tcaaaagctg cagaatctgt 60

gaactgacat cagacccaga aggctaccag aaacagggac tgggcaggcc aaaaagcctt	120
gcgctgaact gcaggc atg gcg cag tac aaa ggc acc atg cgg gaa gct	169
Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala	
1 5 10	
ggc cgg gcc atg cac ctg atc aag aag cgt gag aag cag aag gag cag	217
Gly Arg Ala Met His Leu Ile Lys Lys Arg Glu Lys Gln Lys Glu Gln	
15 20 25	
atg gag gtg ctg aag cag cgc atc gca gag gag acc atc atg aag tca	265
Met Glu Val Leu Lys Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Met Lys Ser	
30 35 40	
aaa gtg gac aag aag ttc tgc gca cac tac gac gcc gtg gag gcc gag	313
Lys Val Asp Lys Lys Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu	
45 50 55	
ctg aag tcc agt acg gtg ggc ctg gtg acc ctg aat gac atg aag gcc	361
Leu Lys Ser Ser Thr Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala	
60 65 70 75	
aag cag gag gcc ctg ctg agg gag cgg gag atg cag ctg gcc aag agg	409
Lys Gln Glu Ala Leu Leu Arg Glu Arg Glu Met Gln Leu Ala Lys Arg	
80 85 90	
gag cag ctg gag caa cgc cgg ata cag ctg gag atg ctg cgc gag aag	457
Glu Gln Leu Glu Gln Arg Arg Ile Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Lys	
95 100 105	
gag cga agg cga gag cgc aag cgc aag atc tcc aac ctg tct ttc acg	505
Glu Arg Arg Arg Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ser Asn Leu Ser Phe Thr	
110 115 120	
ttg gac gag gaa gaa ggt gac caa gag gac agc cgc caa gcc gag agt	553
Leu Asp Glu Glu Glu Gly Asp Gln Glu Asp Ser Arg Gln Ala Glu Ser	
125 130 135	
gcc gag gcc cac agt gct gga gcc aag aag aac ttg ggc aag aat ccc	601
Ala Glu Ala His Ser Ala Gly Ala Lys Lys Asn Leu Gly Lys Asn Pro	
140 145 150 155	
gat gtg gac acg agc ttc ctg ccc gac cgc gag cgc gag gag gag gag	649
Asp Val Asp Thr Ser Phe Leu Pro Asp Arg Glu Arg Glu Glu Glu Glu	
160 165 170	
aac cgg ttg cgc gag gaa ctg cgg cag gag tgg gag gcg aag cgc gag	697
Asn Arg Leu Arg Glu Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Lys Arg Glu	
175 180 185	
aag gtg aag ggc gag gag gtg gag atc acc ttc agc tac tgg gat ggc	745
Lys Val Lys Gly Glu Glu Val Glu Ile Thr Phe Ser Tyr Trp Asp Gly	
190 195 200	
tcc ggc cac cgg cgc acg gtg cgc atg agc aag ggc agc acg gtg cag	793
Ser Gly His Arg Arg Thr Val Arg Met Ser Lys Gly Ser Thr Val Gln	
205 210 215	
cag ttc ctg aag cgg gcg ctg cag ggg ctg cgc agg gac ttc cgg gag	841
Gln Phe Leu Lys Arg Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Asp Phe Arg Glu	
220 225 230 235	
ctg cgg gca gcg ggc gtg gag cag ctc atg tac gtc aag gag gat ctc	889
Leu Arg Ala Ala Gly Val Glu Gln Leu Met Tyr Val Lys Glu Asp Leu	
240 245 250	

atc ctg ccg cac tat cac acc ttc tac gac ttc atc gtg gcc aaa gcc 937
 Ile Leu Pro His Tyr His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Val Ala Lys Ala
 255 260 265

cgg ggc aag agc ggc ccg ctc ttc agc ttc gac gtg cac gac gat gtg 985
 Arg Gly Lys Ser Gly Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp Val
 270 275 280

cgg ctg ctg agc gat gcc acg atg gag aaa gat gag tca cac gcg ggc 1033
 Arg Leu Leu Ser Asp Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala Gly
 285 290 295

aag gtg gtg ctt cgc agc tgg tac gag aag aac aag cac atc ttc cct 1081
 Lys Val Val Leu Arg Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe Pro
 300 305 310 315

gcc agc cgc tgg gag ccc tac gac ccc gag aag aag tgg gac agg tac 1129
 Ala Ser Arg Trp Glu Pro Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Arg Tyr
 320 325 330

acc atc ccg tga tgc caa g tcc cag ttt g ggg acc tta c tcc cta acta 1178
 Thr Ile Arg

tcgaaaatta ataaatacag aggggtccccg taaatcgga 1217

<210> 5
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Maus

<400> 5

Met Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Met Arg Glu Ala Gly Arg Ala Met His
 1 5 10 15

Leu Ile Lys Lys Arg Glu Lys Gln Lys Glu Gln Met Glu Val Leu Lys
 20 25 30

Gln Arg Ile Ala Glu Glu Thr Ile Met Lys Ser Lys Val Asp Lys Lys
 35 40 45

Phe Ser Ala His Tyr Asp Ala Val Glu Ala Glu Leu Lys Ser Ser Thr
 50 55 60

Val Gly Leu Val Thr Leu Asn Asp Met Lys Ala Lys Gln Glu Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Glu Arg Glu Met Gln Leu Ala Lys Arg Glu Gln Leu Glu Gln
 85 90 95

Arg Arg Ile Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Lys Glu Arg Arg Arg Glu
 100 105 110

Arg Lys Arg Lys Ile Ser Asn Leu Ser Phe Thr Leu Asp Glu Glu Glu
 115 120 125

Gly Asp Gln Glu Asp Ser Arg Gln Ala Glu Ser Ala Glu Ala His Ser
 130 135 140

Ala Gly Ala Lys Lys Asn Leu Gly Lys Asn Pro Asp Val Asp Thr Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Pro Asp Arg Glu Arg Glu Glu Glu Glu Asn Arg Leu Arg Glu
 165 170 175
 Glu Leu Arg Gln Glu Trp Glu Ala Lys Arg Glu Lys Val Lys Gly Glu
 180 185 190
 Glu Val Glu Ile Thr Phe Ser Tyr Trp Asp Gly Ser Gly His Arg Arg
 195 200 205
 Thr Val Arg Met Ser Lys Gly Ser Thr Val Gln Gln Phe Leu Lys Arg
 210 215 220
 Ala Leu Gln Gly Leu Arg Arg Asp Phe Arg Glu Leu Arg Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Glu Gln Leu Met Tyr Val Lys Glu Asp Leu Ile Leu Pro His Tyr
 245 250 255
 His Thr Phe Tyr Asp Phe Ile Val Ala Lys Ala Arg Gly Lys Ser Gly
 260 265 270
 Pro Leu Phe Ser Phe Asp Val His Asp Asp Val Arg Leu Leu Ser Asp
 275 280 285
 Ala Thr Met Glu Lys Asp Glu Ser His Ala Gly Lys Val Val Leu Arg
 290 295 300
 Ser Trp Tyr Glu Lys Asn Lys His Ile Phe Pro Ala Ser Arg Trp Glu
 305 310 315 320
 Pro Tyr Asp Pro Glu Lys Lys Trp Asp Arg Tyr Thr Ile Arg
 325 330

<210> 6
 <211> 1232
 <212> DNA
 <213> Maus

<400> 6

ctaaaacctg aaagttattc tgatcaacca tactatacca catgcaaaat ggagtcagag 60
 ctttctgtct cctctgtagc taagatcact aatgagttat tgtatgaaaa ggcaataaaa 120
 tcatgctgtc tggagagtgc caatactttc agactagtgt atcacgtaaa ctcttttagta 180
 acaacctaca cacaaaaatt taatctgtaa taatcaaagg cccaagtgcg caacgcacgt 240
 ccaggaaaac ttcatgggag gattgcattt cagttgtcag gagatcagac gctggcagca 300
 ggactgcac ccatcagtcag tccaagtcgg cagttatata tgaccaccac ctgattggcc 360
 caatctctgt cctgattggt tagagcctgc ctagcagtt ggccaatgtt ttgcatattt 420
 tctgtgtcag ttagaacaaa caatattcgc aaaagcacca gaaggaagag tcttggtc 480
 tacatcaaaa ggtgagggga ctggcttgaa tccagctggg gcagatgtgg gaggtacagc 540
 tctttaaact cgagtaaaac caattgtgaa gggagttgaa tgtagagga aaggaatttg 600
 tccattatcc tgcaagcagg ggagactaat gagccctatc ggtgacataa tatcaacatt 660
 tttattgtaa tttaggaatc acaaactagc aggaaggagg aagatgcctt aaagggtat 720


```

gacatatgca ctaggaaaaat agaaattggg gcttggttctc tctattgggtt gcttttccact 780
gctgtgtcaa aagcaacctt aggaggagga aagggtttat tttgattgac tgtttgactc 840
acatttaatc ctgacagcaa gttggcagaa gcacggagtc atgttggttc tgtagtcaga 900
aagccgagca agataaggac tgcgttcac tgcctttccc tatttctcct ctctactagg 960
tctgagactc acgcccattg gcatggtaag gccatgttca agatggtttg tctttcctca 1020
gttaaactct tctgaaaata ctcccaccag acaacatgcc aagagctgtg taccctaagg 1080
ttccaaatcc tgttagttga caagattaac cattacatga gtctcacctc cttaactcag 1140
gtctgatact gttagcttat agtactgaaa gcatactgaa ggcttcttgt ctctgctaga 1200
ttgctctgaa ctctctcttt ctgccactgc ag 1232

```

<210> 7
 <211> 3007
 <212> DNA
 <213> Maus

<400> 7

```

gaattcaaac aagccaggga gcagcatgag ctttaaagca gcttgcgata tcaaagaaaa 60
gaaagatgct acggaaatgg cgaggaaaca tttagacctt tggaaatgaca tggaaatgtca 120
gagcaaagca ctgtttggga gctatgcggt gaaatgggtg cctcagggga aacaagaggg 180
tttgggggac cagtttggag tttggaaaga gtttgataag aggatgccag ctgttcatgg 240
gaatgagagt ccaccgagta aagaaggagc tacagaaggg ttgggaggga ctgtagaga 300
gcggtcaatt caagttagt ccagttaaata taagagatct ctcttttccc ttgactgaag 360
cacagagaaa acactttgta cttggcccat ctctgttgca tgcagttccc ctgatgtctt 420
gtttctcacg gcaagggagg gagagctcag agttcttttg tgtactttag cactgacaca 480
aagtgagttc cactaaaact ccatgcaaaa atcgttccta agacttggtg taggatgaaa 540
gtctcttggg atctgccaag accataacat taacgggagc ttaacctagc atcatcacc 600
tccaggtgca cgtaggggaa gctttcaagg actcttttct tttccttgct tctgtcctgc 660
aggagtgggg tccaacaagg gcaggtacta tcctaaaagg ccaaccccc tcacaggag 720
acacggtttt ccacttgacc ccagcttcac tgtggctagt tctcaggaa ccaggcccag 780
gctctctcat tgctctgctc ttgcatggct gtgcatgagc agacacgggc agcatgtggt 840
ttgctctgca gaccaacctc tacatgcaaa cccctcaaaa cctactgtac taactcagta 900
gtcacatgag gctatctcag tttgaagtaa aattgctccg ttggtgacag tagttgcatt 960
tcaagtactg aggggccttc tgtgatcagt agttaccaca tcgggtcacc ctggagacag 1020
actcatcaga gaggaagctc cattgtaggg ctctgggtgta gaccattaat gacgcagctg 1080
tactggtttg attctcgagc gttttgttta gttgtgtgtt gtttgttgtt tcctagctgc 1140

```


10

agaatctgtg aactgacatc agaccagaa ggctaccaga aacagggact gggcaggcca	1200
aaaagccttg cgctgaactg caggcatggc gcagtacaaa ggcaccatgc ggggaagctgg	1260
ccgggccatg cacctgatca agaagcgtga gaagcagaag gagcagatgg aggtgctgaa	1320
gcagcgcac gcagaggaga ccatcatgaa gtcaaaagtg gacaagaagt tctcggcaca	1380
ctacgacgcc gtggaggccg agctgaagtc cagtacggtg ggcctggtga ccctgaatga	1440
catgaaggcc aagcaggagg ccctgctgag ggagcgggag atgcagctgg ccaagaggga	1500
gcagctggag caacgccgga tacagctgga gatgctgcgc gagaaggagc gaaggcgaga	1560
gcgcaagcgc aagatctcca acctgtcttt cacgttggac gaggaagaag gtgaccaaga	1620
ggacagccgc caagccgaga gtgccgaggc ccacagtgtt ggagccaaga agaacttggg	1680
caagaatccc gatgtggaca cgagcttccct gcccgaaccgc gagcgcgagg aggaggagaa	1740
ccggttgccgc gaggaactgc ggcaggagtg ggaggcgaag cgcgagaagg tgaagggcga	1800
ggaggtggag atcaccttca gctactggga tggctccggc caccggcgca cgggtgcgc	1860
gagcaagggc agcacggtgc agcagttcct gaagcgggcg ctgcaggggc tgcgcaggga	1920
cttcggggag ctgcgggcag cgggcgtgga gcagctcatg tacgtcaagg aggatctcat	1980
cctgccgcac tatcacacct tctacgactt catcgtggcc aaagcccggg gcaagagcgg	2040
cccgtctctc agcttcgacg tgcacgacga tgtgcggctg ctgagcgatg ccacgatgga	2100
gaaagatgag tcacacgcgg gcaaggtggt gcttcgcagc tggtagaga agaacaagca	2160
catcttccct gccagccgct gggagcccta cgaccccgag aagaagtggg acaggtacac	2220
catccggtga tgccaagtcc cagtttgggg accttactcc ctaactatcg aaaattaata	2280
aatacagagg gtccccgtaa atcggatgtg ttggttctgt acctggcgct attcttcggt	2340
gtttttaatg tttctgtttg tggctccttt gtgttctgtg tgaaaagga catgtttttg	2400
actaagtggg ttgtgcacat tagcttgggt ggccagcaga ctgggtttga tttcttgct	2460
caatgtctta cttgtgttgt gagcaaaatc attgcggtca attgactcct tttccccacc	2520
tatacaagga agttacaccc cttcaggcca gcgtgaggag tgagttaata tttgtaaaca	2580
cttggaactc actcagtaaa tgcttgcgtt ttttgtgggc ctggttgctt tactaaagaa	2640
tgcttacgcg atccatctct gaaatgtcaa aaccagggta gacctgcata tgtcattggt	2700
ttcagggtca gtcggtgcct gaaagctggt gtacagctta taagatcgga ggcgcttatt	2760
tttcttatct tcacccaaag ctacatcta catggcaaga ttctaaatcc cgccctttaa	2820
gtttgtatat gttattcatt gttgagtgtt ttgttaattt tcaactaaaa acgtctaaaa	2880
tacagtgcac ctctttcacg gatTTTTTTT agttaccctt tttatgttaa agaccaagac	2940
ttatactttg gatctcttgc tctgtttctg gcgctgagta cttgcgccag cccaagaaca	3000
tgaattc	3007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ; PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26 June 1997 (1997-06-26) abstract; claims 5-20	1-11
A	TOYODA A ET AL.: "Human HXC-26 gene" EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19 February 1997 (1997-02-19), XP002135680 the whole document	1-6
P, X	SEDLACK Z. ET AL.: " X5L gene; XAP-5-like protein." EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30 June 1999 (1999-06-30), XP002135681 the whole document	1-6



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2000

Date of mailing of the international search report

08/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/ 03972

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

1. Observation : Although Claims Nos. 9-11, in so far as they relate to a in vivo method, relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9722625 A	26-06-1997	AU 1468797 A	14-07-1997

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03972

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ; PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Zusammenfassung; Ansprüche 5-20 ---	1-11
A	TOYODA A ET AL.: "Human HXC-26 gene" EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19. Februar 1997 (1997-02-19), XP002135680 das ganze Dokument ---	1-6
P,X	SEDLACK Z. ET AL.: " X5L gene; XAP-5-like protein." EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30. Juni 1999 (1999-06-30), XP002135681 das ganze Dokument -----	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9-11, insoweit sie sich auf einem in-vivo Verfahren beziehen, auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9722625 A	26-06-1997	AU 1468797 A	14-07-1997

TENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 02 August 2000 (02.08.00)	
International application No. PCT/DE99/03972	Applicant's or agent's file reference K 2767 Wd
International filing date (day/month/year) 08 December 1999 (08.12.99)	Priority date (day/month/year) 10 December 1998 (10.12.98)
Applicant SEDLACEK, Zdenek et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

05 July 2000 (05.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 04 DEC 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



16 T

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts XXX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03972	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/07/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wimmer, G Tel. Nr. +49 89 2399 7347 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-11 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/9-9/9 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-11
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründung der Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

Der Antrag entspricht den Bestimmungen gemäß Art. 33 PCT.

- 1) Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ;PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26. Juni 1997 (1997-06-26)

D2: TOYODA A ET AL.: 'Human HXC-26 gene' EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19. Februar 1997 (1997-02-19), XP002135680

D3: SEDLACK Z. ET AL.: ' X5L gene; XAP-5-like protein.' EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30. Juni 1999 (1999-06-30), XP002135681

Die beanspruchte Priorität der vorliegenden Ansprüche ist gültig. Dokument D3 wurde daher zur Begutachtung dieser Ansprüche nicht einbezogen.

Neuheit gemäß Art. 33(2) PCT.

- 2) Der Stand der Technik beschreibt kein Protein, welches dem der Anmeldung gemäß Fig. 1 entspricht, oder ein Protein, welches zu dem der Anmeldung 80% oder mehr homolog wäre. Ansprüche 1 und 2 werden demnach als neu angesehen.
- 3) Ebenso wird keine DNA-Sequenz gemäß beschrieben, die für ein solches Protein kodieren würde. Ansprüche 3 und 4 sind demnach ebenso neu.
- 4) Durch ihre Referenz auf einen der zuvor genannten Ansprüche, können auch die Gegenstände und Verfahren der Ansprüche 5 - 11 als neu angesehen werden.

Erfinderische Tätigkeit gemäß Art. 33(3) PCT.

- 5) Für die Bereitstellung des Proteins und der entsprechenden DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung, kann Dokument D1 als nächster Stand der Technik herangezogen werden. D1 beschreibt das Growth Hormone Releasing Hormone, und verwandte Peptide, sowie deren Rolle und Verwendung in der Beeinflussung der Spermatogenese.

Jedoch ist das Protein bzw. die Peptide von D1 zum Protein der vorliegenden Anmeldung völlig unterschiedlich; darüber hinaus bestehen in keinem Dokument zum Stand der Technik Hinweise, die den Fachmann zur Isolation des Proteins oder der DNA-Sequenz der Anmeldung leiten würden.

Für Ansprüche 1 - 11 wird deshalb ein erfinderischer Schritt gemäß Art. 33(3) PCT anerkannt.

Gewerbliche Anwendbarkeit gemäß Art. 33(4) PCT.

- 6) Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 9-11 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an (Regel 67.1(iv) PCT); es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

VERTRABER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2767 Wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03972	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/12/1998
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr.

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9–11, insoweit sie sich auf einem in-vivo Verfahren beziehen, auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7. C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 22625 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION ; PESCOVITZ ORA H (US); WILLIAMS DAVI) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Zusammenfassung; Ansprüche 5-20 ---	1-11
A	TOYODA A ET AL.: "Human HXC-26 gene" EMBL DATABASE ; ACCESSION NUMBER D83389, 19. Februar 1997 (1997-02-19), XP002135680 das ganze Dokument ---	1-6
P,X	SEDLACK Z. ET AL.: " X5L gene; XAP-5-like protein." EMBL DATABASE, ACCESSION NUMBER Y18503, 30. Juni 1999 (1999-06-30), XP002135681 das ganze Dokument -----	1-6
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. April 2000		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 08/05/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gurdjian, D



44

Information on patent family members

International Application No.

ACT/DE 99/03972

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

ID. HSD261S3 standard; DNA; HUM; 2471 BP.

XX

AC. D83389;

XX

SV D83389.1

XX

DT 19-FEB-1997 (Rel. 51, Created)

DT 21-JAN-1999 (Rel. 58, Last updated, Version 2)

XX

DE Human HXC-26 gene, exon 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and complete
DE cds.

XX

KW HXC-26.

XX

OS Homo sapiens (human)

OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Teleostomi;

OC Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

XX

RN [1]

RP 1-2471

RA Toyoda A.;

RT ;

RL Submitted (05-FEB-1996) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

RL Atsushi Toyoda, Soka University, Faculty of Engineering; 1-236 Tangi,

RL Hachioji, Tokyo 192, Japan (E-mail:atoyoda@t.soka.ac.jp, Tel:0426-91-9489,

RL Fax:0426-91-9312)

XX

RN [2]

RP 1-2471

RA Toyoda A., Sakai T., Sugiyama Y., Kusuda J., Hashimoto K., Maeda H.;

RT "Isolation and analysis of a novel gene, HXC-26, adjacent to the rab GDP

RT dissociation inhibitor gene located at Xq28 region";

RL Unpublished.

XX

RN [3]

RA Toyoda A., Sakai T., Sugiyama Y., Kusuda J., Hashimoto K., Maeda H.;

RT "Isolation and analysis of a novel gene, HXC-26, adjacent to the rab GDP

RT dissociation inhibitor gene located at human chromosome Xq28 region";

RL DNA Res. 3:337-340(1996).

XX

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source 1..2471

FT /chromosome="X"

FT /db_xref="taxon:9606"

FT /sequenced_mol="DNA"

FT /organism="Homo sapiens"

FT /map="Xq28"

FT intron 1..337

FT /number=4

FT CDS join(D83261.1:692..760,D83388.1:56..140,D83388.1:234..333,

FT D83388.1:837..982,338..414,544..610,747..808,1075..1151,

FT 1535..1589,1737..1785,1883..1953,2063..2173,2278..2286)

FT /codon_start=1

FT /gene="HXC-26"

FT /protein_id="BAAL1907.1"

FT /translation="MHLMKKREKQREQMEQMKQRIAEENIMKSNIDKKFSAHYDAVEAE

FT LKSSTVGLVTLNDMKAQKQALVKEREKQLAKKEQSKELQMKLEKLREKERKKEAKRKIS

FT SLSFTLEEEEEEGGEEEEEAAMYEEEMEREEITTKKRKLGNPDVDTSFPLPDRDREEEEN

FT RLREELRQWEAKQEKIKSEEIEITFSYWDGSGHRRTVKMRKGNMTMQQFLQKALEILRK

FT DFEELRSAGVEQLMYIKEDLIIPHHSFYDFIVTKARGKSGPLNFDFVHDDVRLLSDAT

FT VEKDESHAGKVVLRSWYEKNKHIFPASRWEPYDPEKKWDKYTIR"

FT exon 338..414

FT /number=5

P.D.	19/02/1997
P.	3

FT intron 415..543
 FT /number=5
 FT exon 544..610
 FT /number=6
 FT intron 611..746
 FT /number=6
 FT exon 747..808
 FT /number=7
 FT intron 809..1074
 FT /number=7
 FT exon 1075..1151
 FT /number=8
 FT intron 1152..1534
 FT /number=8
 FT exon 1535..1589
 FT /number=9
 FT intron 1590..1736
 FT /number=9
 FT exon 1737..1785
 FT /number=10
 FT intron 1786..1882
 FT /number=10
 FT exon 1883..1953
 FT /number=11
 FT intron 1954..2062
 FT /number=11
 FT exon 2063..2173
 FT /number=12
 FT intron 2174..2277
 FT /number=12
 FT exon 2278..2471
 FT /number=13
 XX
 SQ

Sequence 2471 BP; 441 A; 762 C; 755 G; 513 T; 0 other;

ctgcagcccc	gacctgcag	gctcaagcga	tcctcccacc	tcagccttct	gagtagctgg	60
tactacaggt	gcgccaccac	accggctga	tttttttgag	ttttagttaga	gacgaggtct	120
tgctatgttg	cccatgctgg	tctccacctc	ctgggctcaa	gtgatecctc	tgccctatcc	180
tccccaagtg	ttgggttgac	aagcgtgagc	ctctgtgccc	gccctaggct	tgtcttctag	240
atcgactgtt	ctcaagggtat	gcttggggga	cctgggcgtc	ggcatatcaa	aatcattttt	300
ataataatgc	tatgatattc	ggcttctttt	gttccagaga	tcaccacgaa	gaagagaaaa	360
ctggggaaga	accagacgt	tgacacaagc	ttcttgccctg	atcgagaccg	tgaggtaaaag	420
gctgcctggc	cctgaccccc	gcctcgactc	cagccctggt	ggagaccctt	gcttagggag	480
ccaggctctg	cgtgcacct	gagcagccct	gggcctcacc	tgtctgcctg	ctccctctcc	540
caggaggagg	agaatoggct	tcgggaagag	ctgcggcagg	agtgggaagc	caagcaggag	600
aagatcaaga	gtgagtgttt	gcggagtcag	acgcgagggg	cctgggcccc	agccagcttc	660
cctgtccaca	gtctcctggg	tggtgcgctg	agccccaagg	ctgctctcag	tggggctgga	720
gaccaagagg	cagctctgcc	ttgtaggtga	ggagatcgag	atcaccttca	gctactggga	780
tggctctggg	caccggcgga	cagtcaaggt	aggcagcgtg	cagcctgctt	cctgctcacc	840
atgggcccag	cctccctcag	gttccgtggg	aaggaaactga	ccttccctgac	ttgggaagcc	900
ccagggatcc	tgaggataac	tggtccagg	gcctggcccc	ctgtctgggg	agtgaggccc	960
aggcctggct	gaggctctgc	agcgtctggc	aggccctct	gggcctctgc	cttgttgaga	1020
gcccttctgc	aggcttccgc	cttcccttcc	caactcctgg	attcccggat	acagatgaga	1080
aagggaaca	ccatgcagca	gttccctgcag	aaggcgctcg	agatccttcc	gaaagacttc	1140
agttagctga	ggtgtgaggt	gtgcgtgtgt	gcacgggtgt	gtgtgtggca	cctgtggctc	1200
cagcccggtg	gccagacacc	cagtgtgatg	tgggcgctgt	ctgggcaagc	aagcagcgtg	1260
ctgggcactc	tcctcccaaa	agaggggggtc	aggctcctct	tccttccct	cccaccagag	1320
agctttgctg	agagcggcct	gccttggttc	cttagcccaa	agggtggagg	tgctgggcgc	1380
cagtcctgtg	ctcactaaac	catggagctt	ccctcacagc	caactggccg	ctgcttccca	1440
gccccagcat	gggctctcct	ggctggctg	tctcctccct	cctggggcag	gggtgctgtc	1500
ctcttgccca	cgccctcctg	ccttccctcc	tcaggctccgc	aggggtggag	cagctcatgt	1560
acatcaagga	ggacttgatc	atccctcacg	tgagtccctt	cagccccagt	acccgcagtg	1620
ggtgcagcac	cctgggcttt	ggctcaggct	ggtgggggca	gtgtgcgcag	gcgggggggtg	1680
tggggagggg	ccgagatgga	ccatcaagac	gccgctttcc	tgcccttggc	tcccagcatc	1740
acagcttcta	cgaacttcac	gtcaccaagg	cacgggggaa	gagtggtgag	tgccgcccag	1800

ccagccgccc	ccatagcacc	ttgccgccga	tgttgctact	ggggcagcag	cgggacattg	1860
ggctgtcact	tctcccctgc	aggaccactc	ttcaactttg	atgttcatga	cgatgtgcgg	1920
ttgctcagtg	acgccactgt	ggagaaggat	gaggtacagc	gtagggggcc	gtgtgagggg	1980
gaacgggtgt	ccctgggcta	tggaggagaa	gccaagggaa	ggggagggtca	gcaggcggcc	2040
ctgtgccctc	ttctccctt	agtcccatgc	aggcaagggtg	gtgctgagga	gctgggtacga	2100
gaagaacaag	cacatctttc	ccgccagccg	ctgggaaccc	tacgaccctg	aaaagaagtg	2160
ggacaagtac	acggtgagga	ggggctggca	gggacccctc	caagtggggg	acggcagcca	2220
gcccctgctc	acccctcgcc	ttccttgtct	cctctgcccc	ccttgctctc	acactagatc	2280
cgctgagcat	ccaggagctg	cgcgcccccg	gtcctcagc	tccctcagtg	tgccccgtgg	2340
tgtcaccggg	actccaggca	cccgtcccc	tgcgaccatg	ccaggcacgc	tgggaggagg	2400
acggcagctg	ctcgtgtcct	gcccctgcc	catcagtgac	tgctttattc	ttttccaata	2460
aagaagtgc	a					2471

ID HOSA18503 standard RNA; HUM; 1618 BP.

XX
AC Y18503;

XP-002135681

P.D.	30/06/1999
p.	2

SV Y18503.1

XX
DT 30-JUN-1999 (Rel. 60, Created)
DT 17-NOV-1999 (Rel. 61, Last updated, Version 2)

XX
DE Homo sapiens mRNA for X5L protein

XX
KW X5L gene; XAP-5-like protein.

XX
OS Homo sapiens (human)
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Teleostomi;
OC Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

XX
RN [1]
RA Sedlack Z., Munstermann E., Dhorne-Pollet S., Otto C., Bock D., Schutz G.,
RA Poustka A.;
RT "Human and mouse XAP-5 and XAP-5-like (X5L) genes: Identification of an
RT ancient functional retroposon differentially expressed in testis";
RL Genomics 61:125-132(1999).

XX
RN [2]
RP 1-1618
RA Sedlacek Z.;
RT ;
RL Submitted (04-DEC-1998) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Z. Sedlacek, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280,
RL 69120 Heidelberg, FRG

XX
DR SPTREMBL; Q9Y247; Q9Y247.

XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..1618
FT /db_xref="taxon:9606"
FT /organism="Homo sapiens"
FT /dev_stage="infant"
FT /tissue_type="brain"
FT CDS 113..1090
FT /db_xref="SPTREMBL:Q9Y247"
FT /gene="X5L"
FT /product="XAP-5-like protein"
FT /protein_id="CAB46272.1"
FT /translation="MAQYKGTMRGRAMHLLKKRERQREQMEVLKQRIAEETILKSQV
FT DKRFSAHYDAVEAEELKSSTVGLVTLNDMKARQEALVRERERQLAKRQHLEEQRLQQERQ
FT REQEQRREKRKRKISCLSFALDDDDQADAAEARRAGNLGKNPDVDTSLPDRDREEEEN
FT RLREELRQEWAEQREKVKDEEMEVTFSYWDGSGHRRTVRVRKGNVTQQFLKKALQGLRK
FT DFLELRSAGVEQLMFIKEDLILPHYHTFYDFIARARGKSGPLFSFDVHDDVRLLSDAT
FT MEKDESHAGKVVLRSWYEKNKHIFPASRWEAYDPEKKWDKYTIR"
FT polyA_signal 1596..1601
FT /gene="X5L"
FT polyA_site 1618
FT /gene="X5L"

XX
SQ Sequence 1618 BP; 356 A; 431 C; 518 G; 313 T; 0 other;
agagcccggg gcgagtgggc ctctgctcgt gggtggttct cgtggagggtc agctcccgcg 60
tgtctccgct cgacagggtg cttgggcaga gcccatcggg taggcgcggg ccatggcgca 120
gtacaagggc accatgcgcg aggcaggccg tgccatgcac ctctcaaga agcgcgaaag 180
gcagcgggag cagatggagg tgctgaagca gcgcacgcc gaggagacca tctcaagtc 240
gcaggtggac aagaggttct cggcgcatta cgacgccgtg gaggcgcagc tgaagtcag 300
cacggtgggc ctggtgacct tgaacgacat gaaggcccg caggagccc tggtcaggga 360

gcgcgagcgg	cagctggc	agcgccagca	cctggaggag	cagcggctgc	agcaggagcg	420
gcagcgggag	caggagcagc	ggcgcgagcg	caagcgtaag	atctcctgcc	tgctcctttgc	480
actagacgac	ctcgatgacc	aggccgacgc	ggccgaggcc	aggcgcgccg	gaaacctggg	540
caagaacccc	gacgtggaca	ccagcttcct	gccagaccgc	gaccgcgagg	aggaggagaa	600
ccggctccga	gaggagctgc	gccaagagtg	ggaggcgag	cgcgagaaag	tgaaggacga	660
ggagatggag	gtcaccttca	gctactggga	cggctcgggc	caccggcgca	cgggtgcgggt	720
gcgcaagggc	aacacggtgc	agcagttcct	gaagaaggcg	ctgcaggggc	tgcgcaaggga	780
cttcctggag	ctgcgctccg	ccggcggtgga	gcagctcatg	ttcatcaagg	aggacctcat	840
cctgccgcac	taccacacct	tctacgactt	catcatcgcc	agggcgaggg	gcaagagcgg	900
gccgctcttc	agcttcgatg	tgcacgatga	cgtgcgcctg	ctcagcgacg	ccaccatgga	960
gaaggacgag	tcgcacgcgg	gcaagggtgt	gctgcgcagc	tggtacgaga	agaacaagca	1020
catcttcccc	gccagccgct	gggaggccta	tgaccccgag	aagaagtggg	acaagtacac	1080
catccgctaa	caccgcctg	ccagagcgga	aaccgggggt	ggggggagac	actcatttct	1140
aggccccatc	accagtcact	tgatttcgtg	accttgattt	cttcccccaa	atttaataaa	1200
gacagagggt	tctcatgatt	cacattgggt	gtgctattgc	tgatgttatg	ctttggttgc	1260
ttggttggtc	ttttctgagt	atttttagtgt	tgccacctgg	atttgctgca	ttgctctgct	1320
gagctgtatt	gaaaccatga	ctgggcccac	tgtcagacag	aaattagaat	aggaggcaca	1380
ttttttacct	ggtgggttatg	agcatggact	tgggggccac	agtgactgag	tttgattccc	1440
gacacagcct	cctccttgct	gtgtagtttt	gggtaagctt	attaaacccc	catgcctcag	1500
tttggtcacc	tgtaaaagga	aataacaaga	gcacttactt	tataagattg	atgtgagtat	1560
taagtgaatt	aatattttgta	aaacgccttag	ctcttaataa	atgtttctgt	tgttatta	1618

//



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07K 14/60, 16/22, C12N 15/18, 15/63, 15/70, 15/74, 15/79, C12Q 1/00, A61K 38/17	A1	(11) International Publication Number: WO 97/22625 (43) International Publication Date: 26 June 1997 (26.06.97)
(21) International Application Number: PCT/US96/20622 (22) International Filing Date: 20 December 1996 (20.12.96) (30) Priority Data: 60/008,933 20 December 1995 (20.12.95) US (71) Applicant (for all designated States except US): INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION [US/US]; Showalter House, P.O. Box 500, Bloomington, IN 47402 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): PESCOVITZ, Ora, H. [US/US]; 1313 Regal Drive, Carmel, IN 46032 (US). WILLIAMS, David, A. [US/US]; 8751 N. Moore Road, Indianapolis, IN 46278 (US). KELLEY, Mark, R. [US/US]; 11356 Brentwood Avenue, Zionsville, IN 46077 (US). (74) Agents: GANDY, Kenneth, A. et al.; Woodard, Emhardt, Naughton, Moriarty & McNett, Bank One Center/Tower, Suite 3700, 111 Monument Circle, Indianapolis, IN 46204 (US).		(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(54) Title: GHRH-RP COMPOSITIONS AND METHODS (57) Abstract Described are novel uses of GHRH-RP polypeptides for specifically activating Sertoli cell expression of stem cell factor and promoting spermatogenesis and fertility, and for inhibiting GHRH-RP activity to decrease or eliminate spermatogenesis and fertility. Also described are pharmaceutical compositions for such uses, and transgenic animals lacking expression of or expressing introduced DNA encoding GHRH-RP polypeptides.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

GHRH-RP COMPOSITIONS AND METHODS

5

This invention was made with support from NIH Grant Nos. RO1 DK41899, KO4 DK02042 and F32 DK09000. The government has certain rights in the invention.

10

REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims priority upon U.S. Patent
15 Application Serial No. 60/008,933 filed December 20, 1995,
which is hereby incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND

20 The present invention relates generally to
biotechnology, and in particular to novel uses and
production of Growth Hormone Releasing Hormone Related
Peptide (GHRH-RP).

25 As further background, Growth Hormone Releasing Hormone
(GHRH) is known to be the hypothalamic factor that
stimulates the release of pituitary growth hormone. Rat
GHRH mRNA and peptide have been identified in multiple
tissues outside of the hypothalamus including gut, placenta
30 and gonads. M.O. Thorner et al., *Acta Endocrinol [Suppl]*
(Copenh) **276**, 34 (1986); T.C. Bruhn, R.T. Mason, W. Vale,

-2-

Endocrinology 117, 1710 (1985); O.H. Pescovitz, N. Johnson, S.A. Berry, *Pediatr. Res.* 29, 510 (1990); G. Meigan, A. Sasaki, K. Yoshinaga, *Endocrinology* 123, 1098 (1988); A. Bagnato, C. Moretti, J. Ohnishi, G. Frajese, K.J. Catt, 5 *Endocrinology* 130, 1097 (1992); S.A. Berry and O.H. Pescovitz, *Endocrinology* 123, 661 (1988). Southern blot analysis of rat genomic DNA indicates that there is a single GHRH gene. Alternate first exons are used to regulate differential GHRH mRNA transcription in various 10 tissues. K.E. Mayo, G.M. Cerelli, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, *Nature* 314, 464 (1985); Gonzalez-Crespo and A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8749 (1991); C.H. Srivastava, B.S. Monts, J.K. Rothrock, M.J. Peredo, O.H. Pescovitz, *Endocrinology* 136, 1502 (1995). Exons 2 through 15 5 are common to all tissues and encode for a 104 amino acid GHRH precursor peptide. This peptide is cleaved into a 29 amino acid N-terminal signal peptide, the mature 43 amino acid GHRH peptide, and a putative 30 amino acid C-terminal peptide, referred to as GHRH-Related Peptide (GHRH-RP).

20

GHRH is postulated to have arisen from a single ancestral gene approximately 1250 million years ago. R.M. Campbell and C.G. Scanes, *Growth Regulation* 2, 175 (1992). This gene is believed to give rise to the various GHRH 25 family members including glucagon, secretin, pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), and vasoactive intestinal peptide (VIP). While the other members of this family are known to produce more than one functional peptide from their precursor proteins, exon loss 30 was hypothesized to explain the occurrence of a single peptide product for both the GHRH and secretin genes. R.M.

-3-

Campbell and C.G. Scanes, *Growth Regulation* 2, 175 (1992). Pre-pro-VIP produces both peptide histidine isoleucine and VIP and proteolytic cleavage of the PACAP precursor produces PACAP-related peptide and PACAP.

5

The GHRH mRNA and peptide and other members of the GHRH family have previously been identified in testicular tissue. S.A. Bery, C.H. Srivastava, L.R. Rubin, W.R. Phipps, O.H. Pescovitz, *J. Clin. Endo. Metab.* 75, 281 (1992); M. Ohta, S. Funakoshi, T. Kawasaki, N. Itoh, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183, 390 (1992); S. Shioda et al., *Endocrinology* 135, 818 (1994); R. Hakanson, F. Sundler, R. Uddman, in *Vasoactive Intestinal Peptide*, S. Said, Ed. (Raven Press, New York 1982), pp. 121-144. The GHRH transcript is localized to spermatogenic cells, is developmentally regulated and is actively transcribed during the onset of spermatogenesis. C.H. Srivastava et al., *Endocrinology* 133, 83 (1993); S.A. Berry and O.H. Pescovitz, *Endocrinology* 127, 1404 (1990). Northern blot analysis of RNA from separated testicular cells demonstrates the highest amounts of GHRH mRNA in spermatocytes and immature round spermatids. GHRH mRNA is not present in more mature elongating spermatids and epididymal sperm. Using immunohistochemical analysis, the GHRH peptide is localized to both germ cells (O.H. Pescovitz et al., *Endocrinology* 127, 2336 (1990)) and Leydig cells (T. Ciampani, A. Fabbri, A. Isidori, M.L. Dufau, *Endocrinology* 131, 2785 (1992); A. Fabbri, D.R. Ciocca, T. Ciampani, J. Wang, M.L. Dufau, *Endocrinology* 136, 2303 (1995)). A GHRH receptor is transcribed in rat Sertoli cells (C.H. Srivastava et al., *Endocrine Journal*.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2, 607 (1994)) and treatment of cultured Sertoli cells with GHRH activates Sertoli cell *c-fos* and stem cell factor gene expression (C.H. Srivastava, P.R. Breyer, J.K. Rothrock, M.J. Peredo, O.H. Pescovitz, *Endocrinology* **133**, 1478 (1993)). Both of these Sertoli cell products are crucial for the normal progression of spermatogenesis. R.S. Johnson, B.M. Spiegelman, V. Papaioannou, *Cell* **71**, 577 (1992); K.M. Zsebo et al., *Cell* **63**, 213 (1990); E. Huang et al., *Cell* **63**, 225.

10

In the area of fertility management, the literature has taught the treatment of human female infertility by administration of gonadotropins such as follicle stimulating hormone (FSH) combined with luteinising hormone (LH), and the addition of GHRH to this mixture to improve the therapy. Tests have also been derived to predict whether the FSH/LH/GHRH regimen will benefit the patient. See, e.g., U.S. Patent No. 5,175,111. In this area it is also known that inhibition of FSH, for example with FSH-Inhibiting Protein (FSH-IP), can be used to provide contraception in males and females, since FSH is required for maturation of ovarian follicles and testicular spermatogenesis. In addition, disruption of FSH-IP activity, e.g. by administration of antibodies to FSH-IP, has been taught as a means for promoting fertility. See, e.g., U.S. Patent No. 5,037,805.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

In one feature of the invention, it has been discovered that GHRH-RP specifically activates stem cell factor (SCF), a factor crucial for normal spermatogenesis, in Sertoli cells. Accordingly, methods of the invention involve the use of GHRH-RP in the management or control of fertility in patients, including to stimulate the production of stem cell factor, and spermatogenesis, and the reduction of GHRH-RP activity in Sertoli cells to inhibit production of SCF and spermatogenesis in mammals.

Another embodiment of the invention concerns a pharmaceutical composition for stimulating the production of SCF or promoting spermatogenesis in mammals, including GHRH-RP and a pharmaceutically-acceptable carrier.

The present invention also provides an isolated nucleotide encoding GHRH-RP which is free from the GHRH coding sequence, vectors incorporating such nucleotides, host cells transformed by such vectors, and methods involving culturing the host cells under conditions effective to produce GHRH-RP. Preferably, the nucleotide is a cDNA encoding GHRH-RP and also containing a sequence coding for a leader which facilitates secretion of the encoded polypeptide from the host cell, and a sequence encoding a proteolytic site for cleavage of the polypeptide to remove the leader.

The present invention also provides transgenic mammals which overexpress GHRH-RP in all or selected tissues, and

which lack expression of GHRH-RP in all or selected tissues.

Still another feature of the present invention concerns the discovery that the GHRH gene, as transcribed in testis, includes not only the five previously-known exons in the gene, but also a sixth exon as a result of alternative splicing. This further exon, which is exon 1 in testis, is located about 700 bp upstream in the genome from that of placental exon 1. The invention thus also provides an isolated polynucleotide including testis exon 1, preferably in addition to the other five known exons in the GHRH gene.

The present invention provides novel methods employing or inhibiting GHRH-RP to manage fertility in mammals, including humans. The methods of the invention are expected to provide new fertility-promoting and contraceptive treatments in humans and other animals. The present invention also provides nucleotides, vectors and host cells for the convenient production of GHRH-RP, and transgenic mammals useful in screening and study of GHRH-RP and related factors. Additional objects, features and advantages of the present invention will be apparent from the following description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1. is a schematic diagram which illustrates the structure of the rat GHRH gene and the GHRH precursor peptide.

Figs. 2 A-D are photomicrographs depicting the immunohistochemical localization of GHRH-RP in adult rat testis.

Figs. 3 A-C are photomicrographs depicting the immunohistochemical localization of GHRH-RP in rat hypothalamus.

Fig. 4. shows Western gel analysis of rat hypothalamus and testis tissue extracts.

Fig. 5. shows Northern blot analysis of GHRH-RP specific Sertoli cell gene expression.

Fig. 6. is a graph illustrating the stimulation of adenylate cyclase in cultured Sertoli cells.

Fig. 7 shows the sequences of three alternative GHRH transcripts found in germ cells, as described in Example 5 below. 7A, complete sequence of one transcript, with the putative peptide sequence shown. The consensus poly(A) addition signal is overlined. The region of sequence heterogeneity adjacent to the poly(A) signal is underlined. 7B, alternative transcript containing testis exon 1 spliced to the 3'-portion of placental exon 1 (testis exon 1A).

-8-

7C, alternative transcript containing the entire sequence of testis exon 1 (boldface type), placental exon 1 (underlined), and the intervening genomic sequence as one contiguous exon 1 sequence. In all three transcripts, the exon boundaries are indicated by verticle lines above the letters, and the ATG translation start site is indicated by an asterisk.

Fig. 8 shows a diagram of the rat GHRH gene. Fig. 8A, genomic clones (clones 1 and 23, Example 5) isolated from a λ library. A restriction map of the XhoI fragment containnig the placental and testicular first exons is shown: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; X, XhoI. Fig. 8B, proposed structure of the GHRH gene. The exons are numbered. Testis 1A contains most of the sequence of placenta exon 1. Testis alt ex 1 contains the testicular and placenal first exons as well as the entire genomic sequence between them. Fig. 8C, GHRH transcripts in three different tissues: (light shading) = hypothalamic GHRH exon 1; (dark shading) = on possible placental GHRH exon 1; (filled) = testicular GHRH exon 1; (cross-hatch) = GHRH exons 2-5. The dashed lines connect testicular exon 1 and placental exon 1, forming a contiguous exon.

Fig. 9 shows the sequence of the 5' flanking region of testicular GHRH, as described in Example 5 below. The 5' transcription initiation site defined by RACE analysis has been designated nucleotide 1. The underlined sequences represent consensus sequences for transcription factor binding; a site 80% homologous to a spermatogenic-specific binding site in the c-mosD gene is located at -517, an SP1

-9-

site is located at -493, and sites homologous to those found in the spermatogenesis-specific proenkephalin promoter are found at -210 and -130. A TATA-like sequence is shown in boldface type. Potential transcription initiation sites are indicated by asterisks.

Fig. 10 shows the results of Northern blot analysis of GHRH mRNA in testis and placenta. Fig. 10A, diagram of the exon 1 and exon 3-5 probes used (Example 5, below). Fig. 10B, autoradiograms of blots. Left panel, twenty micrograms of total placenta or germ cell poly(A)+ RNA were hybridized to the 733-bp exon 1 probe described in Example 5. Right Panel, ten micrograms of testicular poly(A)+ RNA were hybridized to either the testicular exon 1 probe (lane 1) or a GHRH exon 3-5 probe (lane 2).

Fig. 11 shows the results of Southern blot analysis of the rat GHRH gene as described in Example 5. Rat liver DNA was digested with BamHI (B), EcoRI (E), or HindIII (H); subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel; transferred to a nylon membrane; and hybridized to either a probe extending from -200 to the 3'-end of testicular exon 1 or to a GHRH exon 3-5 probe.

Fig. 12 shows an analysis of GHRH exon 1 in hypothalamus and testis as described in Example 5. RT-PCR was performed on RNA from testicular germ cells (G), hypothalamus (H) or liver (L) using the primers indicated at the left. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized to the GHRH exon 3-5 probe.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 13 is a schematic diagram showing SS (primers: a and b) and RP (primers: c and d) fragment as generated by PCR amplification, as described in Example 7. SS-RP is generated by the overlay extension method using a and d primers.

Fig. 14 is shows PCR amplification of control and SS and RP cDNAs. These PCR products wre analyzed by electrophoresis on an ethidium bromide-containing 2.0% agarose gel and photographed. Sizes of 100 bp ladder are also indicated. The product sizes are: SS (118bp); RP (121bp).

Fig. 15 shows second PCR amplification of control and SS-RP cDNA as described in Example 6. The PCR products were analyzed by electrophoresis on an ethidium bromide-containing 2.0% agarose gel and photographed. Sizes of 100 bp ladder are also indicated.

20

Fig. 16 shows the confirmation of the identity of subcloned DNA by plasmid DNA digestion with EcoRI and SalI, as described in Example 6. The digestions were analyzed on an ethidium bromide-containing 2.0% agarose gel and photographed. The sizes of the DNA SS-RP was as predicted (203 bp). Sizes of 100 bp ladder are indicated.

25

Fig. 17 shows the sequence of the PCI vector with the SS-RP insert, as described in Example 6 below. EcoRI and SalI were used for cloning. The sequence is precisely as predicted. SS-RP sequencing is underlined.

30

Fig. 18 is a schematic diagram illustrating the production of transgenic mammals in accordance with the invention, as described in Example 7 below.

5

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

For the purposes of promoting an understanding of the principles of the invention, reference will now be made to preferred embodiments thereof and specific language will be used to describe the same. It will nevertheless be understood that no limitation of the scope of the invention is thereby intended, such alterations and further modifications in the invention, and such further applications of the principles of the invention as described therein being contemplated as would normally occur to one skilled in the art to which the invention relates.

As discussed above, one aspect of the present invention concerns regulating intratesticular stem cell factor (SCF) levels and/or spermatogenesis in a mammal by regulating the level of GHRH-RP. As discussed in more detail below, it has been discovered that GHRH-RP stimulates the production of SCF in Sertoli cells, a factor which is required for spermatogenesis. Accordingly, it is expected that spermatogenesis can be promoted by increasing the intratesticular level of GHRH-RP, e.g. by the administration of GHRH-RP peptide preparations or the overexpression of a nucleotide encoding GHRH-RP. It is also expected that spermatogenesis can be inhibited or eliminated by decreasing the intratesticular level of active GHRH-RP, e.g. by the administration of antibodies to GHRH-RP, the knock-out or down-regulation of a mammal's expression of its GHRH-RP DNA, by anti-sense RNA to the GHRH-RP mRNA, by competitive antagonists or agonists to

-13-

GHRH-RP binding, or by otherwise interfering with the processing of the GHRH pre-protein to biologically active GHRH-RP.

5 As further background information concerning GHRH-RP, Southern blot analysis of genomic DNA indicates that there is a single GHRH gene. In particular, FIG. 1 shows the structure of the rat GHRH gene and the GHRH precursor peptide. The rat GHRH gene consists of 5 exons with
10 alternate first exons for testis (TEST), placenta (PLAC) and hypothalamus (HYPOTHAL). Exons 2 through 5 encode the GHRH precursor peptide in all tissues studied to date. Subsequent processing of the precursor peptide yields a 29 amino acid N-terminal signal peptide, the mature 43 amino
15 acid GHRH and a 30 amino acid C-terminal peptide, GHRH-RP. Alternate first exons are used to regulate differential GHRH mRNA transcription in various tissues. K.E. Mayo, G.M. Cerelli, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, *Nature* 314, 464 (1985). Gonzalez-Crespo and A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8749 (1991); C.H. Srivastava, B.S. Monts, J.K. Rothrock, M.J. Paredo, O.H. Pescovitz, *Endocrinology* 136, 1502 (1995).

Specifically, the amino acid sequences of specific
25 GHRH-RP peptides useful in the present invention are given below:

-14-

SEQUENCE NO. 1: Human

	Gln	Val	Asp	Ser	Met	Trp	Ala	Glu	Gln	Lys	Gln	Met	Glu	13
	1				5					10				
	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Gln	Lys	His	Ser	26
5		15				20					25			
	Arg	Asn	Ser	Gln	Gly									31
					30									

SEQUENCE NO. 2: Mouse

10	Gln	Glu	Asp	Ser	Met	Trp	Thr	Glu	Asp	Lys	Gln	Met	Thr	13
	1				5					10				
	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Gln	Gly	Phe	Pro	Arg	Met	Lys	Pro	26
		15				20					25			
	Ser	Ala	Asp	Ala										30
15					30									

SEQUENCE NO. 3: Rat

	His	Leu	Asp	Arg	Val	Trp	Ala	Glu	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	13
	1				5					10				
20	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Gln	Gly	Phe	Pro	Arg	Met	Lys	Leu	26
		15				20					25			
	Ser	Ala	Glu	Ala										30
					30									

25

In addition to native forms of the GHRH-RP polypeptides, the present invention also concerns the use of polypeptides having amino acid sequences similar to those of the native polypeptides, but into which

30 modifications are naturally provided (e.g. allelic variations in the nucleotide sequence which may result in

-15-

amino acid changes in the polypeptides) or deliberately engineered. Modifications of interest in the sequences may include the replacement, insertion or deletion of one or more amino acid residues in the coding sequence. For
5 example, the modified polypeptide may contain one or more additional amino acids, at one or both ends of the polypeptide chain; may have an amino acid sequence which differs from that of the naturally-occurring polypeptide; or may be an active fragment of the naturally-occurring
10 polypeptide.

Illustrative modifications which may be undertaken include, for example, substituting one polar amino acid, such as glycine for another polar amino acid; or one acidic
15 amino acid, such as aspartic acid, may be substituted for another acidic amino acid such as glutamic acid; or a basic amino acid, such as lysine, arginine or histidine may be substituted for another basic amino acid; or a non-polar amino acid, such as alanine, leucine or isoleucine may be
20 substituted for another non-polar amino acid.

The term "substantially identical." is used herein to encompass such potential modifications, and specifically herein means that a particular subject sequence, for
25 example, a mutant sequence, varies from the native sequence by one or more substitutions, deletions, or additions, the net effect of which is to retain biological activity of the native peptide. Alternatively, DNA analog sequences are substantially identical to the specific DNA sequences
30 disclosed herein if: (a) the DNA analog sequence is derived from substantially the entire coding regions of the native

mammalian GHRH-RP genes; or (b) the DNA analog sequence is comparable in length with and capable of hybridization to DNA sequences of (a) under moderately stringent conditions (defined in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2Ed. Vol. 1, pp. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) as including the use of a prewashing solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0) and hybridization conditions of about 55°C, 5 X SSC, overnight) and which encode biologically active GHRH-RP molecules; or (c) DNA sequences which are degenerate as a result of the genetic code to the DNA analog sequences defined in (a) or (b) and which encode biologically active GHRH-RP molecules. Preferred substantially identical analog polypeptides will be greater than about 80 percent similar to the corresponding sequence of the native protein, and in particular in the case of GHRH-RP to the more highly-conserved sequence including amino acids 1 to 19. Sequences having lesser degrees of similarity but comparable biological activity are considered to be equivalents. In defining nucleic acid sequences, all subject nucleic acid sequences capable of encoding substantially similar amino acid sequences are considered substantially similar to a reference nucleic acid sequence.

Percent similarity may be determined, for example, by comparing sequence information using the GAP computer program, version 6.0, available from the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). The GAP program utilizes the alignment method of Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), as revised by Smith and Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981). Briefly, the GAP program

-17-

defines similarity as the number of aligned symbols (i.e., nucleotides or amino acids) which are similar, divided by the total number of symbols in the shorter of the two sequences. The preferred default parameters for the GAP program include: (1) a uniary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) for nucleotides, and the weighted comparison matrix of Gribskov and Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) a penalty of 3.0 for each gap and an additional 0.10 penalty for each symbol in each gap; and (3) no penalty for end gaps.

Thus, in a preferred aspect of the invention the GHRH-RP polypeptide used will be encoded by a DNA sequence selected from:

- (a) the coding region of a native GHRH-RP gene;
- (b) a DNA sequence which hybridizes under moderately stringent conditions to the DNA of (a) and encodes a polypeptide which stimulates the production of SCF in Sertoli cells; and
- (c) a DNA sequence that encodes a polypeptide having the amino acid sequence of the polypeptides encoded by the DNA sequences of (a) and (b).

-18-

Preferred polypeptides for use in the invention are thus provided having an amino acid sequence selected from:

(a) an amino acid sequence of a native GHRH-RP polypeptide; or

(b) an amino acid sequence that is substantially identical to (a).

10 In specific work to date, to test for the presence of a putative GHRH-RP peptide, antisera were generated by BSA-conjugating rat GHRH-RP and immunizing rabbits with 500 mg of GHRH-RP in Complete Freund's Adjuvant. Booster injections of 250 mg GHRH-RP in Incomplete Freund's Adjuvant and GHRH-RP antisera were characterized by ELISA. The
15 antisera, which did not cross-react with GHRH, VIP, PCAP, Secretin, PHI or glucagon (≤ 1 mg), were used in immunohistochemistry performed on testes of adult rats as described in Example 1 below. Abundant GHRH-RP
20 immunoactivity was present in the acrosomes at nearly all stages of germ cell development as illustrated in Figures 2A-D. To generate the photomicrographs shown, rat seminiferous tubules were incubated with preimmune rabbit sera (NRS) on the left and GHRH-RP specific antisera on the
25 right. (A) 100X magnification of several different stage tubules. 200X magnification of a single seminiferous tubule at (B) Stage IV, (C) Stage VII, and (D) Stage XIII. Intense specific staining predominated in stage IV seminiferous tubules in the pachytene primary
30 spermatocytes, step 4 secondary spermatocytes and step 17 elongating spermatids (Figure 2B).

To estimate the size of the peptide identified in testis, Western gel analysis was performed as described in detail in Example 2 below. Briefly, Figure 4 shows the results of experiments in which SDS-PAGE was performed and GHRH-RP antigen-antibody complex revealed by chemiluminescence. Controls were synthetic GHRH (100 ng) and synthetic GHRH-RP (100 ng). The sample is shown as (TESTIS) (2 mg). Protein molecular mass markers are indicated on the left. Using the GHRH-RP antisera that did not recognize GHRH (Figure 4), a band of approximately 3.5 kDa was seen in the GHRH-RP control lane as expected. In testis a 3.5 kDa band predominated that was consistent with the size of synthetic GHRH-RP (Figure 4) suggesting that in testicular germ cells the GHRH precursor peptide is not stored.

As indicated above, it has been discovered that GHRH-RP has a unique testicular action. GHRH-RP specifically activated SVF in Sertoli cells as described in Example 3 below. Briefly, Figure 5 shows the results of work in which Rat Sertoli cells, isolated and cultured for 4 days were treated with rat GHRH-RP (10 nM and 100 nM), rat GHRH (10 nM) or control media for 16 hours. Northern gel analysis of 10 μ g of total Sertoli cell RNA was performed and the blot probed for SCF, transferrin, androgen binding protein (ABP), α -inhibin and γ -actin as control. B. Bloch, A. Baird, N. Ling, R. Guillemin, Endocrinology 118, 156 (1986). Stimulation of SCF expression is 12 fold over control at 10 nM and 16 fold at 100 nM concentrations of GHRH-RP. GHRH (10 nM) stimulated stem cell factor gene

-20-

expression 3 fold over control. There was no stimulation of transferrin, ABP or α -inhibin gene expression over control using GHRH-RP or GHRH. Other Sertoli cell specific transcripts including transferrin, ABP and α -inhibin were

5 note regulated by GHRH-RP (Figure 6). Although a functional GHRH receptor has been identified in Sertoli cells (R.S. Johnson, B.M. Spiegelman, V. Papaioannou, *Cell* 71, 577 (1992); K.M. Zsebo et al., *Cell* 63, 213 (1990); E. Huang et al., *Cell* 63, 225), the GHRH-RP stimulation of

10 stem cell factor expression may not be mediated through this receptor. Unlike GHRH, GHRH-RP does not stimulate increases in adenylate cyclase in cultured Sertoli cells, as demonstrated in Example 4 below. Briefly, shown in Fig. 6 are the results of experiments in which rat Sertoli

15 cells, isolated and cultured for 4 days were incubated with GHRH-RP (100 nM), GHRH (100 nM), FSH (0.0275 U/ml) or control media for 30 minutes at 37°C. The cells were then assayed for cAMP production by ¹²⁵I cAMP Radioimmunoassay C.H. Srivastava, J.D. Fleck, A.M. Meyers, S.A. Berry, O.H. Pescovitz, "Distribution of Growth Hormone Releasing

20 Hormone-Like (HRH-LI) mRNA and Immunoreactivity in Rat Tissues" (Abstract), *The Endocrine Society, 73rd Annual Endocrine Society, Washington, D.C. (1991)*. Adenylate cyclase stimulation is measured as fold stimulation of

25 control. Each bar is representative of five separate experiments.

As to the production of GHRH-RP polypeptides for use in the invention, nucleic acid sequences encoding the

30 polypeptides may be constructed using standard recombinant DNA technology, for example, by cutting or splicing nucleic

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-21-

acid sequences using restriction enzymes and DNA ligase. Alternatively, nucleic acid sequences may be constructed using chemical synthesis, such as solid-phase phosphoramidate technology. Polymerase chain reaction (PCR) may also be used to accomplish splicing of nucleic acid sequences by overlap extension as known in the art.

The segment of the polynucleotide chain which encodes GHRH-RP is, of course, designed according to the genetic code; however, because of the degeneracy of the genetic code, a wide variety of codon combinations can be selected to form the polynucleotide chain which encodes the product polypeptide. It is known that certain specific codons are more efficient for expression in certain types of organisms, and the selection of codons can be made according to those codons which are most efficient for expression in the type of organism to serve as focus for the recombinant vector. Nonetheless, any correct set of codons will encode the desired product. Codon selection may also be dependent upon considerations of vector construction, e.g. it may be necessary to avoid inserting a restriction site in the polynucleotide chain if the vector is to be later manipulated with a corresponding restriction enzyme, or if the ultimate host organism produces the corresponding restriction enzyme.

As is conventional, the polynucleotide chain containing the GHRH-RP sequence can also contain linkers at its ends to facilitate insertion and to restriction sites in a cloning vector. The polynucleonic tide chain may also encode a fusion polypeptide and when so constructed will

usually contain terminal sequences encoding amino acid sequences serving as proteolytic processing sites, whereby the GHRH-RP polypeptide may be proteolitically cleaved from the remainder of the fusion peptide. Other conventional sequences may also be included, e.g. appropriate start and stop signals.

DNA encoding GHRH-RP polypeptides for use in the invention can be conventionally incorporated into viral, plasmid or other vectors and used to transform host cells to achieve expression of the polypeptide in the cells. The hybrid DNA molecules are expressed by operatively linking them to an expression control sequence in an appropriate expression vector, which in turn is used to transform an appropriate unicellular host. The operative linking of a hybrid DNA sequence of this invention to an expression control sequence includes the provision of a translation start signal in the correct reading frame upstream of the DNA sequence. Therefore, a coding sequence is "operatively linked to" another coding sequence when RNA polymerase will transcribe the coding sequence into mRNA which is then translated into a polypeptide.

In selecting an expression control sequence, a variety of factors should also be considered. These include, for example, the relative strength of the system, its controllability, and its compatibility with the particular DNA sequence, of this invention, particularly as regards potential secondary structures. Unicellular hosts should be selected by consideration of their compatibility with the chosen vector, the toxicity of the product coded on

-23-

expression by the DNA sequences of this invention to them, their secretion characteristics, their ability to fold proteins correctly, their stability and culturing requirements, and the ease of purification of the products coded on expression by the DNA sequences of this invention.

Illustrative suitable host cells for GHRH-RP polypeptide expression include, for example, prokaryotic and eukaryotic cells. Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described, for example, in Pouwels et al. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985).

Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example, *E. coli* or *Bacilli*. Suitable prokaryotic host cells for transformation include, for example, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and various other species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*.

Expression vectors for use in prokaryotic host cells generally comprise one or more phenotypic selectable marker genes. A phenotypic selectable marker gene is, for example, a gene encoding a protein that confers antibiotic resistance or that supplies an autotrophic requirement. Examples of useful expression vectors for prokaryotic host cells include those derived from commercially available plasmids such as the cloning vector pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides simple means for identifying

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-24-

transformed cells. To construct an expression vector using pBR322, an appropriate promoter and a flt3-L DNA sequence are inserted into the pBR322 vector. Other commercially available vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA).

Promoter sequences commonly used for recombinant prokaryotic host cell expression vectors include β -lactamase (penicillinase), lactose promoter system (Chang et al., *Nature* 275:615, 1978; and Goeddel et al., *Nature* 281:544, 1979), tryptophan (trp) promoter system (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; and EP-A-36776) and tac promoter (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982).

Flt3-L polypeptides alternatively may be expressed in yeast host cells, preferably from the *Saccharomyces* genus (e.g., *S. cerevisiae*). Other genera of yeast, such as *Pichia*, *K. lactis* or *Kluyveromyces*, may also be employed. Yeast vectors will often contain an origin of replication sequence from a 2 μ yeast plasmid, an autonomously replicating sequence (ARS), a promoter region, sequences for polyadenylation, sequences for transcription termination, and a selectable marker gene. Suitable promoter sequences for yeast vectors include, among others, promoters for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) or other glycolytic enzymes (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; and Holland et al., *Biochem.* 17:4900, 1978), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-25-

hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. Other suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described
5 in Hitzeman, EPA-73,657 or in Fleer et. al., *Gene*, 107:285-195 (1991); and van den Berg et. al., *Bio/Technology*, 8:135-139 (1990). Another alternative is the glucose-repressible ADH2 promoter described by Russell et al. (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) and Beier et al. (*Nature* 300:724, 1982). Shuttle vectors replicable in both yeast and *E. coli* may be constructed by inserting DNA sequences from pBR322 for selection and replication in *E. coli* (Ampr gene and origin of replication) into the above-described
10 yeast vectors.

The yeast α -factor leader sequence may be employed to direct secretion of the flt3-L polypeptide. The α -factor leader sequence is often inserted between the promoter
20 sequence and the structural gene sequence. See, e.g., Kurjan et al., *Cell* 30:933, 1982; Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984; U.S. Pat. No. 4,546,082; and EP 324,274. Other leader sequences suitable for facilitating secretion of recombinant polypeptides from
25 yeast hosts are known to those of skill in the art. A leader sequence may be modified near its 3' end to contain one or more restriction sites. This will facilitate fusion of the leader sequence to the structural gene.

30 Yeast host cells transformed by vectors containing ADH2 promoter sequence may be grown for inducing expression

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-26-

in a "rich" medium. An example of a rich medium is one consisting of 1% yeast extract, 2% peptone, and 1% glucose supplemented with 80 mg/ml adenine and 80 mg/ml uracil. Derepression of the ADH2 promoter occurs when glucose is exhausted from the medium.

Illustrative eukaryotic host cells which may be used for polypeptide expression include, for example, yeast cells, CHO, R1.1, B-W and L-M cells, African green monkey cells (including COS1, COS7, BSC1, BSC40, and BMT110 cells), and human cells (including erythroblasts, monocytes, myeloids, T-lymphocytes, B-lymphoblastoid cells, smooth muscle cells, endothelial cells, Sertoli cells, fibroblasts, etc.), and cell lines developed from the foregoing. These cells can be cultured in accordance with conventional procedures known to the art and literature, and the polypeptides produced can likewise be recovered and purified conventionally.

The present invention is not intended to be limited by the choice of vector or host cell. It should of course be understood that not all vectors and expression control sequences will function equally well to express the DNA sequences of this invention. Neither will all hosts function equally well with the same expression system. However, one of skill in the art may make a selection among these vectors, expression control sequences, and hosts without undue experimentation and without departing from the scope of this invention.

30

-27-

The present invention also provides pharmaceutical compositions for stimulating Sertoli cell SCF production and spermatogenesis which include GHRH-RP polypeptides as discussed above. Compositions of this invention, for promoting spermatogenesis, will generally include a therapeutically effective amount of a GHRH-RP polypeptide in a pharmaceutically acceptable carrier. The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of protein which will stimulate spermatogenesis. The precise dosage necessary will vary with the age, size and condition of the patient, the nature and severity of the disorder to be treated, and the like. Thus, a precise effective amount cannot be specified in advance and will be determined by the care giver. Appropriate amounts may be estimated by routine experimentation with animal models.

Any pharmaceutically-acceptable carrier which is compatible with the active ingredients is contemplated. Pharmaceutically-acceptable carriers include for instance insert solid diluents or fillers, sterile aqueous solution and various organic solvents. The use of such carriers is well known in the art. In this regard, the phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human. Pharmaceutical compositions, formed by combining a GHRH-RP polypeptide and pharmaceutically-acceptable carriers, are then easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Particularly for parental administration, solutions of the protein in oils such as sesame or peanut oil, aqueous propylene glycol, or in sterile aqueous solution (desirably isotonic) may be employed. These aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about sterile preparation and by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid,

-29-

thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the
5 compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the GHRH-RP polypeptide in the required
10 amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic
15 dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the GHRH-
20 RP polypeptide plus any additional desired ingredient from a previously sterile filtered solution thereof.

Pharmaceutical compositions of the invention may be administered in any suitable manner, including for instance
25 potentially parenteral, sublingual, intratesticular, and intrapulmonary. Parenteral administration includes, for instance, intramuscular, subcutaneous, intravenous, intraarterial and intraperitoneal administration. In one preferred mode the GHRH-RP composition will be administered
30 via the testis.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-30-

In addition, in accordance with the invention, GHRH-RP may be co-administered with other therapies for increasing fertility, including for instance the administration of gonadotropins or gonadotropin releasing factors, e.g. human chorionic gonadotropin, human menopausal gonadotropin, FSH, or gonadotropin releasing hormone, or of a synthetic androgen, activin (see e.g. U.S. Patent No. 5,166,190), or the like. In this regard, GHRH-RP may be administered along with or separately from these other therapeutics, and before, simultaneously or after the administration of the other fertility therapies.

The present invention also provides monoclonal or polyclonal antibodies to GHRH-RP, which are useful in immunohistochemical studies and in inhibiting GHRH-RP in vivo to reduce a mammal's production of stem cell factor in Sertoli cells and inhibit spermatogenesis. Such antibodies can be conventionally raised in appropriate mammals such as rabbits. In addition, standard hybridoma technology can be employed to produce monoclonal antibodies to GHRH-RP, if desired. Antibodies to GHRH-RP can also be conjugated to suitable imaging agents such as x-ray, MRI, or PET imaging agents, and administered to mammals, e.g. intratesticularly, to enable externally-generated imaging of GHRH-RP localization and relative levels in the testis, particularly germ cells. Such protocols may be used to provide useful research and screening for any GHRH-RP abnormalities.

The present invention also provides a transgenic mammal all or some cells of which express (preferably over-

-31-

express) introduced DNA encoding the GHRH-RP peptide, and transgenic mammals all or some cells of which lack expression of the GHRH-RP peptide. Such transgenic mammals can be constructed using standard pronuclear injection technique, as specifically described in the Example 6 below. Such mammals may be used, for example, in the study of GHRH-RP function spermatogenesis and other biological functions, e.g. those related to appetite or other functions whose regulation involve the hypothalamus, and in the screening of agents for inhibiting or promoting spermatogenesis and controlling fertility, or for regulating appetite.

In order to promote a further understanding and appreciation of the present invention and its features and advantages, the following specific Examples are provided. It will be understood that these Examples are illustrative, and not limiting, of the invention.

EXAMPLE 1

Preparation of GHRH-RP Peptide

Rat GHRH-related peptide was synthesized from the deduced amino acid sequence (amino acids 74-104) (K.I. Mayo, G.M. Cerelli, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, Nature 314, 464 (1985). Gonzalez-Crespo and A. Boronat, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8749 (1991); C.H. Srivastava, B.S. Monts, J.K. Rothrock, M.J. Peredo, O.H. Pescovitz, Endocrinology 136, 1502 (1995)) in the Biochemistry Biotechnology Facility at Indiana University. The peptide was conjugated to BSA and antisera were produced by N.

-32-

Beaudry in four rabbits (Hazelton Labs, Vienna, VA). The rabbits were pretreated with pertussis vaccine, followed by 500 µg GHRH-RP in Complete Freund's Adjuvant, fortified with killed M. Tuberculosis. Multiple intradermal
5 injections were given at dorsal sites. Booster injections of 250 µg GHRH-RP in Incomplete Freund's Adjuvant were given at three week intervals and the immunized rabbits were bled 10-14 days after each booster. The GHRH-RP antisera were assayed and characterized by ELISA. The
10 antisera were specific for GHRH-RP and did not cross react with rat GHRH, VIP, PACAP, secretin, PHI and glucagon at concentrations up to 1 µg.

Adult rat testes were frozen in dry ice cold
15 isopentane and then embedded in Tissue-Tek (Miles Inc., Elkhart, IN). Twelve µm sections were cut at -20°C in a Reichert-Jung cryostat and mounted on poly-L-lysine coated slides. The sections were soaked in 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS fixative at room temperature for
20 60 minutes. The brains from adult rats, perfused at sacrifice with 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS, were sectioned (35 µm) and the sections floated in 0.1 M PBS containing 0.5% Triton-X. Each tissue was then rinsed with 0.1 M PBS containing 0.5% Triton-X and blocked in the same
25 buffer containing 10% normal goat serum. They were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-GHRH-RP sera at a dilution of 1:2000, followed by sequential 60 minute incubations at room temperature with the second antibody, biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200), and substrate,
30 avidin DH-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-33-

Burlingame, CA). Each step was followed by three 10 minute washes with 0.1 M PBS containing 0.5% Triton-X. The slides were developed in a DAB (3,3'-diaminobenzadine)-hydrogen peroxide solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

5 Controls included substitution of preimmune sera for primary antisera and antisera pre-adsorbed with excess antigen (100 μ M GHRH-RP). Testicular sections were counterstained with cresyl violet. Hypothalamic sections were counterstained with methyl green.

10

EXAMPLE 2

Estimation of Size of Peptide

Western gel analysis was performed on crude tissue
15 preparations of rate hypothalami and isolated testicular germ cells. Germ cells were isolated from six adult Sprague-Dawley rat testes using sequential collagenase and trypsin treatments as previously described [L.J. Romrell, A.R. Bellve, D.W. Fawcett, Dev. Biol., **49**, 119 (1976)].
20 The isolated germ cells and five hypothalami from adult Sprague-Dawley rats were homogenized in the presence of antiproteases (50 μ M pepstatin A, 30 KIU/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM leupeptin and 1 mM iodoacetamide). These extracts were partially purified over Sep-Pak C18 columns
25 (Waters, Milford, MA), eluted with 20%, 45% and 80% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid and lyophilized. The tissue samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [U.K. Laemmli, Nature, **227**, 681 (1970)], after boiling for 6
30 minutes in 2.3% SDS-10% glycerol, 62.5 mM Tris, 5% mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue adjusted with

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-34-

HCl to pH 6.8. Samples were separated on a 15% SDS polyacrylamide gel run overnight at 15 mA at room temperature and were transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (0.45 μ m pores; Millipore, Bedford, MA) for 90 minutes at 80 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol, pH 8.3 at 4C. The standard used for SDS-PAGE was the low range protein molecular mass standards (Gibco BRL, Grand Island, NY). The membrane was blocked for 1 hour in 50 mM Tris buffer, 105 mM NaCl, 0.1% Tween, pH 7.5, containing 5% nonfat dried milk. The immunoreactions were performed at a 1:2000 dilution of the primary antisera overnight at 40C in Tris buffered saline pH 7.6, 0.1% Tween, 0.5% nonfat dried milk. Immunodetection by chemiluminescence was performed using the ECL Western blotting kit (Amersham, Arlington Heights, IL). Secondary goat antirabbit antisera was used at 1:1500 dilution. Signal specificity was evaluated by substitution of the primary antisera with antisera pre-adsorbed with excess antigen (50 μ M GHRH-RP). The bands of interest (3.5 kDa and 10 kDa) were completely blocked using the pre-adsorbed antisera.

EXAMPLE 3

Activation of SCF in Sertoli Cells

25

Sprague-Dawley rats (20-22 day old) were obtained from Harlan Labs (Indianapolis, IN). All animals were maintained in accordance with the guidelines set by the Animal Use and Care Committee of I. U. School of Medicine (#A-3392-01). Sertoli cells were isolated using sequential collagenase and trypsin treatment and cultured using

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-35-

modifications of the method of Dorrington and Fritz
[*Endocrinology* 94:879, 1975]. Sertoli cells were plated on
100 mm dishes and cultured at 32°C in 10 ml of Ham's F12
media supplemented with 9 mM HEPES, pH 7.5, 215 µg/ml L-
5 glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 50
µg/ml gentamycin, and 0.625 µg/ml fungizone. Media was
changed three days after plating and on day 4, Sertoli
cells (3×10^6 /plate) were incubated with 10 and 100 nM rat
GHRH-RP or rat GHRH as well as control media for 16 hours.
10 Cell purity was monitored by phase contrast microscopy and
by comparative reverse transcription-polymerase chain
reaction (RT-PCR) amplification. RT-PCR (25 cycles) was
performed on the isolated Sertoli cell RNA using primer
pairs for 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and GHRH to
15 evaluate for Leydig cell and germ cell contamination
respectively [Monts et al., *Peptides of the Growth Hormone-
Releasing Hormone Family*, *Endocrine* 4:1 pp. 73-78 (1996)].
The Sertoli cell RNA had no detectable contamination from
these testicular cell types.

20

Sertoli cells were harvested by plate scraping and the
RNA isolate by the guanidinium thiocyanate-phenol-
chloroform extraction method [P. Chomczynski and N. Sacchi,
Anal. Biochem. 162, 156 (1987)]. For Northern analysis, 10
25 µg of total RNA from each sample was electrophoresed on a
1.2% agarose gel containing 6.7% formaldehyde in MOPS
buffer and then transferred and cross linked to a 0.45 µM
MagnaGraph nylon membrane (MSI, Westboro, MA). The blots
were hybridized to the following probes: murine SCF cDNA
30 probe shown to cross-react with SCF (provided by David A.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Williams, Indiana University), rat α -inhibin cDNA probe (provided by Kelly E. Mayo, Northwestern University), rat androgen binding protein (ABP) cDNA probe (provided by David R. Joseph, University of North Carolina), rat
5 transferrin riboprobe (provided by Michael Griswold, Washington State University), and a human γ -actin cDNA probe which cross-hybridizes with rat actin (provided by Winston A. Salswer, UCLA) to control for RNA loading and transfer. cDNA probes were ^{32}P -labeled by the hexanucleotide primer
10 method using a kit from Stratagene (La Jolla, CA) and the blots were hybridized at 42°C overnight. The transferrin riboprobe was ^{32}P -labeled using a kit from Promega (Madison, WI) and the blots hybridized at 60°C overnight. The blots were washed with 0.1X SSC and exposed to film at -80°C.
15 Autoradiograms were scanned on a Microtek Scanmaker II, and data were quantified using Sigma Scan (Jandel Scientific, San Rafael, CA) using actin as control.

EXAMPLE 4

20 Mechanism of Action

Rat Sertoli cell cultures were prepared as described in Example 3 above. B. Bloch, A. Baird, N. Ling, R. Guillemin, *Endocrinology* 118, 156 (1986). On day 4 of
25 culture, Sertoli cells were treated with GHRH-RP (100 nM), GHRH (100 nM), FSH (0.0275 U/ml) or vehicle for 30 minutes at 37°C. The cells were lysed in 0.05M glacial acetic acid, scraped off plates and then boiled and iced for 5 minutes. The resultant supernatant was assayed for cAMP using the
30 Rianen ^{125}I cAMP radioimmunoassay kit from Du Pont

-37-

(Wilmington DE). Results were performed in triplicate and reproduced using several culture experiments.

5

EXAMPLE 5**Demonstration of Testis Exon 1**

In this Example, it was demonstrated that GHRH mRNA found in testis includes an exon 1 sequence different from that in other tissues including the hypothalamus and placenta, and that the initiation of GHRH transcription in testis begins approximately 700 bp 5' to that in placenta and approximately 10.7 kbp 5' to that in the hypothalamus. In addition, it has been found that regions of DNA just upstream of testicular exon 1 (and placenta exon 1) stimulate transcription in vitro in a rat germ cell nuclear extract, and thus these regions are expected to contain functional promoters.

20 Animals

Male Sprague-Dawley rats were obtained from Harlan (Indianapolis, IN). All animals were maintained in accordance with the guidelines set by the animal use and care committee of Indiana University School of Medicine.

25

Plasmids and probes

The plasmid prghrf-2, containing exon 3 through the polyadenylated [poly(A)⁺] rat hypothalamic GHRH cDNA (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Lebo, R.V., Bruce, B.D., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) "Characterization of cDNA and Genomic Clones Encoding the Precursor to Rat Hypothalamic

-38-

Growth Hormone-Releasing Factor", *Nature*, 314:464-467), was obtained from Dr. Ron Evans (Salk Institute, La Jolla, CA). an *EcoRI-HindIII* insert containing exons 3-5 was used as a probe. The plasmid EE5.0 containing 5 kilobases (kb) of
5 GHRH genomic sequence was obtained from Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Evanston, IL). A 1.5-kb *PvuII-BglIII* fragment extending from -500 basepairs (bp) relative to the hypothalamic transcription initiation site into hypothalamic intron A (Id.) was excised for use as a probe
10 to screen the genomic library. The testicular exon 1 probe for the genomic Southern was a 307-bp PCR product extending from -200 relative to the initiation of transcription (Fig. 3) to the 3'-end of testicular exon 1. The testicular exon 1 probe for the Northern blot was a 733-bp PCR product
15 prepared from genomic DNA, extending from the 5'-end of testicular exon 1 to the 3'-end of placental exon 1. For hybridization, probes were labeled with ³²P by the random primer method of Fineberg and Vogelstein (Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983) "A Technique for Radiolabeling DNA
20 Restriction Fragments to High Specific Activity", *Anal. Biochem.*, 132:6-13), using a Prim-It kit (Stratagene, La Jolla, CA).

Cell fractionation and RNA analysis

25 Germinal (spermatogenic) cells were isolated using sequential collagenase and trypsin treatment of adult testis, as described previously (Srivastava, C.H., Collard, M.W., Rothrock, J.K., Peredo, M.J., Berry, S.A., Pescovitz, O.H. (1993) "Germ Cell Localization of a Testicular GHRH-
30 Like Factor", *Endocrinology*, 133:83-89; Mesitrich, M.L., Bruce, W.R., Clermont, Y. (1973) "Cellular Composition of

Mouse Testis Cells Following Velocity Sedimentation Separation", *Exp. Cell. Res.*, 79:213-227; Romrell, L.J., Bellve, A.R., Fawcett, D.W. (1976) "Separation of Mouse Spermatogenic Cells by Sedimentation Velocity", *Dev. Biol.*, 49:119-131). RNA was extracted from germinal cells, total testis, and other tissues by the guanidinium thiocyanate-phenon-chloroform extraction method (Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Extraction", *Anal. Biochem.*, 162:156-159). Poly(A)⁺RNA was isolated using oligo(deoxythymidine)-cellulose (Collaborative Research, Bedford, MA). For Northern analysis, RNA was subjected to electrophoresis on a 1.5% formaldehyde-agarose gel in 3[N-morpholino]propanesulfonic acid buffer and transferred to a nylon membrane. Hybridization conditions were described previously (Srivastava, C.H., Breyer, P.R., Rothrock, J.K., Peredo, M.J., Pescovitz, O.H. (1993) "A New Target for Growth Hormone Releasing-Hormone Action in Rat: The Sertoli Cell", *Endocrinology*, 133:1478-1481; Srivastava, C.H., Rado, T., Bauerle, D., Broxmeyer, H.E. (1991) "Regulation of Human Bone Marrow Lactoferrin and Myeloperoxidase Gene Expression by Tumor Necrosis Factor-Alpha", *J. Immunol.*, 146:1014-1019).

Library screening

A rat liver genomic library in a λ EMBL3 vector, purchased from Clontech (Palo Alto, CA), was screened with the GHRH probe described above. Two positive clones, clones 1 and 23, were purified and digested with *Xho*I. Fragments of 4 and 6 kb that mapped at the 5'-ends of

-40-

clones 23 and 1, respectively, were subcloned into the vector pGEM 7Z (Promega, Madison, WI).

A rat testicular cDNA library in a λ GT11 vector was purchased from Clontech and screened with the GHRH cDNA probe. One positive clone was detected and purified. The GHRH cDNA insert was removed by digestion with *EcoRI* and subcloned into pGEM 7Z for DNA sequencing using a Sequenase kit (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH), [³⁵S]deoxy-ATP, and SP 6 and T7 primers (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467). Sequence analysis was performed using the University of Wisconsin Genetics Computer Group sequence analysis software (Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984) "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387-395).

RACE protocol

All primers were provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility, Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine (Indianapolis, IN).

For the 5'-RACE, a kit from Gibco-BRL (Gaithersburg, MD) was used. Germ cell poly(A)⁺ RNA (1 μ g) was used as a template for cDNA synthesis, with a GHRH exon 3-specific primer of the sequence 5'-GGCTGTTTCATGATTTTCGTGCAGCAGTTTGC-3'. The cDNA was C-tailed and amplified by PCR using a 5'-primer the anchor primer supplied with the kit and a second nested exon 3 primer of the sequence 5'-ATATAATTGGCCCAGGATTCTCCGGTA-3'. The reaction products were

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-41-

subjected to Southern blot analysis, using a ghrh exon 2 oligonucleotide probe. A second aliquot of each RACE product was electrophoresed on a 1.8% agarose gel, and a band of the size detected on the Southern blot was excised and purified using a Spin-X column (Costar, Cambridge, MA). The DNA fragment was cloned using the Clone-Amp system (Gibco-BRL), as previously described (Srivastava, C.H., Kelley, M.R., Monts, B.S., Wilson, T.M., Breyer, P.R., Pescovitz, O.H. (1994) "Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor mRNA is Present in Rat Testis", *Endocr. J.*, 2:607-610; Kelley, M.R., Jurgens, J.K., Tentier, J., Emanuele, N.V., Blutt, S.E. Emanuele, M.A. (1993) "Coupled Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique is Comparative, Quantitative, and Rapid: Uses in Alcohol Research Involving Low Abundance mRNA Species Such as Hypothalamic LHRH and GRF", *Alcohol*, 10:185-189). DNA from the resulting colonies was used for sequencing. Sequence obtained during the first round was used to synthesize an oligonucleotide primer for a second RACE reaction.

20

The 3'-RACE protocol was used to confirm the testicular GHRH mRNA sequence obtained from the cDNA clone. It was carried out as described by Frohman et al. (Frohman, M.A. (1990) "RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends", In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, J.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp 28-28; Frohman, M., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988) "Rapid Production of Full-Length cDNAs from Rare Transcripts: Amplification Using a Single Gene-Specific Oligonucleotide Primer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8998-9002), using the exon 3 primer 5' CAT-

25

30

-42-

GCAGACGCCATCTTCACCAGC 3' for the 5' primer and the primer specified by Frohman (Frohman, M.A. (1990) "RACE:Rapid Amplification of cDNA Ends", In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, J.J. (eds) PCR Protocols: A
5 Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp 28-28) for the 3'-primer in the PCR reaction.

RT-PCR analysis

These procedures were performed as described previously (Srivastava, C.H., Kelley, M.R., Monts, B.S., Wilson, T.M., Breyer, P.R., Pescovitz, O.H. (1994) "Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor mRNA is Present in Rat Tests", *Endocr. J.*, 2:607-610; Kelley, M.R., Jurgens, J.K., Tentler, J., Emanuele, N.V., Blutt, S.E., Emanuele, M.A.
15 (1993) "Coupled Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique is Comparative, Quantitative, and Rapid:Uses in Alcohol Research Involving Low Abundance mRNA Species Such as Hypothalamic LHRH and GRF", *Alcohol*, 10:185-189). Three micrograms of total RNA were mixed with
20 100 pmol oligo(deoxythymidine) primers (Promega) and H₂O, heated to 75 °C for 10 min, and quenched on ice. Reverse transcriptase reaction buffer, placental ribonuclease inhibitor, and Superscript II reverse transcriptase (all from Gibco-BRL) were then added, and the reaction mix (in a
25 final volume of 20 µl) was incubated at room temperature for 10 min and at 42 °C for 50 min. The reaction was terminated by heating at 95 °C for 5 min and quenching on ice. Ribonuclease-H (1 µl; Gibco-BRL) was then added to the reaction and incubated for 20 min at 37 °C.

30

-43-

Five microliters of the reverse transcription reaction from each sample were subjected to PCR. The PCR was carried out using 35 cycles of amplification (94 °C, 30 sec; 57 °C, 45 sec; 72 °C, 2 min), followed by 10 min at 72 °C.

5 After PCR, an aliquot of each reaction was electrophoresed on 1.8% agarose gels and transferred to nylon membranes. The blots were hybridized under conditions previously described (Srivastava, C.H., Kelley, M.R., Monts, B.S., Wilson, T.M., Breyer, P.R., Pescovitz, O.H. (1994) "Growth

10 Hormone-Releasing Hormone Receptor mRNA is Present in Rat Testis", *Endocr. J.*, 2:607-610). The PCR products were cloned and sequenced as described above. The PCR primers were: testicular GHRH exon 1, 5'-ACGGAACATCGAGCCAAATCCA-3'; placental GHRH exon 1, 5'-CTGGATCCCACAACTGCACA-3';

15 hypothalamic GHRH exon 1, 5'-AGAGGGATACCTGTCACCTCA-3'; GHRH exon 2, 5'-TGCCCCCCTCACCTCCCTTC-3'; GHRH exon 4 (3'-primer), 5'-GGCGGTTGAACCTGGATCTT-3' and testicular GHRH 5'-flanking, 5'-CATTGAGCTTATTGGAGCGTT-3'.

20 For PCR reactions in which the products were sequenced, (CAU)₄ or (CUA)₄ was added to the 5'-end of the primers for use with the Clone-Amp system (Gibco BRL, Grand Island, NY).

25 *Genomic Southern blot*

Rat liver DNA was isolated by standard protocols (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Ed 2, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. Duplicate 10-µg aliquots

30 were digested to completion with *Bam*HI, *Eco*RI, or *Hind*III; subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel; and

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-44-

transferred to a nylon membrane. The blots were hybridized to either a GHRH exon 3-5 probe or a testicular GHRH exon 1 probe.

5 The Genbank Accession numbers for the reported sequences in this Example are U10153, U10154, U10155, and U101056.

Results

10 To characterize the GHRH mRNA in testis, sequence analysis of a GHRH clone isolated from a testicular cDNA library was performed. The clone contained exons 2-5 of the mRNA, which were found to have a sequence identical to that of hypothalamic GHRH mRNA in the protein-coding region
15 (Fig. 7A). Slight heterogeneity was seen in the 20 nucleotides immediately adjacent to the poly(A) sequence. This may result from polymorphism in the gene due to strain differences in the rats or to a cloning artifact. The putative peptide sequence is shown and is identical to the
20 hypothalamic pre-pro-GHRH (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) "Characterization of cDNA and Genomic Clones Encoding the Precursor to Rat Hypothalamic Growth Hormone-Releasing Factor", *Nature*, 314:464-467).

25

To determine the sequence of exon 1 of testicular GHRH mRNA, the 5'-RACE protocol and, subsequently, RT-PCR, using testicular exon 1- and exon 4-specific primers, were employed. Figure 7A shows the sequence of one testis-
30 specific transcript. The exon 1 sequence is located approximately 700 by up-stream in the genome from that of

-45-

placental exon 1. Figure 7, B and C, depict two alternative transcripts. Figure 7B shows a transcript containing part of placental exon 1 (Gonzales-Crespo, S., Boronat, A. (1991) "Expression of the Rat Growth Hormone-Releasing Hormone Gene in Placenta is Directed by an Alternative Promoter", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8749-53) (labeled testis exon 1A) spliced between testicular exon 1 and exon 2. Figure 7C shows a transcript containing a 740-nucleotide exon 1 extending from the 5'-end of testicular exon 1 through testicular exon 1A (placental exon 1) and containing all of the intervening genomic sequence. The sequences of exons 2-4 of these transcripts were identical to those of hypothalamic GHRH mRNA. The data demonstrate that multiple GHRH transcripts exist in testis, and that they arise from alternative splicing between exons 1 and 2.

Based on these and previously reported data (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) "Characterization of cDNA and Genomic Clones Encoding the Precursor to Rat Hypothalamic Growth Hormone-Releasing Factor", *Nature*, 314:464-467; Gonzalez-Crespo, S., Boronat, A. (1991) "Expression of the Rat Growth Hormone-Releasing Hormone Gene in Placenta is Directed by an Alternative Promoter", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:749-53), we predicted the structure of the rat GHRH gene (Fig. 8, B and C). One placental GHRH exon 1 is shown; several potential sites for initiation of GHRH transcription in placenta had previously been found (Id.). In the model shown in Fig. 8, B and C, testicular transcription begins approximately 700 bp 5' to transcription initiation in the placenta and more

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-46-

than 10.7 kbp 5' to that in hypothalamus. We found at least three transcripts in testis; these result from alternative splicing. Based on the sequence of these, some testicular GHRH transcripts contain six exons.

5

We next defined the site of initiation of transcription of the GHRH gene in the testis. A genomic probe extending from -500 bp relative to the hypothalamic transcription initiation site through hypothalamic intron A was used to isolate clones from a rat genomic library. Two clones, clones 1 and 23, were purified and characterized (Fig. 8A). Clone 1 extends 3000 bp up-stream of testicular exon 1, and clone 23 extends 1000 bp up-stream of testicular exon 1, and clone 23 extends 1000 bp up-stream of testicular exon 1. The genomic clones were sequenced to approximately -660 bp relative to the initiation of transcription detected by RACE analysis. Computer analysis showed a TAT-like sequence at -60 bp and several cis-acting elements in the promoters of genes expressed in testis (Kilpatrick, D.K., Zinn, S.A., Fitzgerald, M., Higuchi, H., Sabol, S.L., Meyerhardt, J. (1990) "Transcription of the Rat and Mouse Proenkephalin Genes is Initiated at Distinct Sites in Spermatogenic and Somatic Cells", *Mol. Cell. Biol.*, 10:3717-3726; van der Hoorn, F.A. (1991) "Identification of the Testis C-Mos Promoter: Specific Activity in a Seminiferous Tubule-Derived Extract and Binding of a Testis-Specific Nuclear Factor", *Oncogene*, 7:1093-1097) (Fig. 9). Three potential transcription initiation sites were determined by 5'-RACE and by RT-PCR (Fig. 9). Repeated RACE using testicular exon 1

-47-

oligonucleotide as the 3'-PCR primer did not reveal any further sequence at the 5'-end of the testicular GHRH mRNA.

To confirm the presence of GHRH mRNA containing
5 testicular exon 1 and the alternative first exons in
testis, Northern blot analysis was performed on poly(A)⁺ RNA
from whole testis or germ cells, using either a genomic DNA
probe extending from testicular exon 1 through placental
exon 1 or a cDNA exon 3-5 probe. As shown in Fig. 10, the
10 genomic probe (Fig. 10A) hybridized to RNA from both germ
cells and placenta (Fig. 10B, left panel) as well as RNA
from whole testis (Fig. 10B, right panel). At least two
species of hybridizing RNA were seen, one similar in size
to the 750-nucleotide transcript found in placenta and
15 hypothalamus (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Rosenfeld, M.G.,
Evans, R.M. (1985) "Characterization of cDNA and Genomic
Clones Encoding the Precursor to Rat Hypothalamic Growth
Hormone-Releasing Factor, *Nature*, 314:464-467; Frohman,
M.A., Downs, T.R., Chomczynski, P., Frohman, L.A. (1989)
20 "Cloning and Characterization of Mouse Growth Hormone-
Releasing Hormone (GRH) Complementary DNA: Increased GHR
Messenger RNA Levels in the Growth Hormone-Deficient
Lit/Lit Mouse", *Mol. Endocrinol.*, 3:1529-1536; Gonzalez-
Crespo, S., Boronat, A. (1991) "Expression of the Rat
25 Growth Hormone-Releasing Hormone Gene in Placenta is
Directed by an Alternative Promoter", *Proc. Natl. Sci. USA*,
68:8749-53) and, in addition, a larger species of 1.5-1.7
kb, as had been seen previously (Berry, S.A., Pescovitz,
O.H. (1988) "Identification of a GHRH-Like Substance and
30 its Messenger RNA in Rat Testis", *Endocrinology*, 123:661-
663; Bagnato, A., Moretti, C., Ohnishi, J., Frajese, G.,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Catt, K.J. (1992) "Expression of the Growth Hormone-Releasing Hormone Gene and its Peptide Product in the Rat Ovary", *Endocrinology*, 130:1097-1102). The same species of RNA were detected with a GHRH exon 3-5 probe (Fig. 10B, right panel).

It is possible that the alternative GHRH transcripts found in testis result from a second GHRH gene. This is not likely, as there is only one copy of the human GHRH gene, located on chromosome 20 (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Lebo, R.V., Bruce, B.D., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) "Gene Encoding Human Growth Hormone-Releasing Factor Precursor: Structure, Sequence and Chromosome Assignment", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:63-67). However, to test this possibility, we performed a Southern blot analysis of BamHI-, EcoRI-, and HindIII-digested rat liver genomic DNA, using a GHRH exon 3-5 probe. We detected only the bands seen by Mayo et al. (Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) "Characterization of cDNA and Genomic Clones Encoding the Precursor to Rat Hypothalamic Growth Hormone-Releasing Factor", *Nature*, 314:464-467) in their genomic clones, suggesting that there is only one copy of the GHRH gene in the rat (Fig. 11, right panel). This is confirmed by the finding that the testicular exon 1 probe hybridized to only one restriction fragment in each lane (Fig. 11, left panel). The restriction fragments detected by this probe are identical to those of the genomic clones isolated by us from a library and to those previously detected with a placental cDNA probe (Gonzales-Crespo, S., Boronat, A. (1991) "Expression of the Rat Growth Hormone-Releasing Hormone Gene in Placenta is

-49-

Directed by an Alternative Promoter", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8749-53).

To determine whether transcripts containing
5 hypothalamic exon 1 are present in testis or whether
transcripts containing testicular exon 1 are present in
hypothalamus, RT-PCR using testicular or hypothalamic exon
1 primers and the exon 4 primer on germ cell or
hypothalamic RNA was performed. Liver RNA was included as
10 a negative control. Figure 12 shows a Southern blot of the
PCR products hybridized to the GHRH exon 3-5 probe. As
shown in the top panel, several products were detected in
the germ cell RNA with the testicular exon 1 primer, as
previously noted, but none was seen in the hypothalamic
15 RNA. Conversely, with the hypothalamic exon 1 primer, a
product was detected only in the hypothalamus. PCR with
the exon 2-4 primers resulted in products in both testis
and hypothalamus, in agreement with the sequence data. No
product was detected in liver with any of the primers.
20 These data do not exclude the possibility that these
transcripts are expressed at low levels not detected by our
methods.

EXAMPLE 6

25 Recombinant Expression of GHRH-RP Polypeptide

6.1 Construction of SS-RP and SS-RP Expression.

A. Generation of Signal-Sequence/RP cDNA by PCR 30 Amplification

-50-

Plasmid PGEM-4 (2,871 bp) containing a 634 bp mouse GRF-E2 cDNA (from Mayo laboratory) was used as a template in PCR amplification reactions. SS and RP cDNAs were generated using the following reaction conditions: DNA templates (1 µg) were added to a 50 µl total volume solution containing 2xPCR buffer (10mM Tris-HCl PH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), and 200 µM of dNTP. To the mixture, added to 50 pmol of each of two synthetic oligonucleotides were added: Primer R1-SS-a (5'-AGACGAATTCATGCTGCTC TGGGTGCTC-3') contains a recognition sequence for *EcoRI* and a sequence of 10 nt complementary SS at 5' end. Primary WQ-RP-b (5'-GGGAAGTCCTACGTCGCTGTCCTTCTGTCGTACACC-3') and primer PR-QW-c (5'-CCCTTCAGGATGCAGCGACAGGAAGACAGCATGTGG-3') have 18 nt complementary to the 3' end of SS DNA sequence and 18 nt complementary to the 5' end of RP DNA sequence. Primer Stop-SalI-d (5'-TTCGGAAGTCGCCTGCGAACTCAGCTGCAGA-3') is complementary to the 3' end of RP DNA sequence and also contains 13 nt which encode a stop codon and a *SalI* restriction site (Fig. 13). TFL DNA polymerase (Pharmacia LKB) was added to the PCR reaction and DNA amplification was performed for 30 cycles in DNA thermal cycler (conditions: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 60 s, and extension at 72°C for 2 min for each cycle). After amplification, 50 µl of each PCR reaction mixture were fractionated by electrophoresis (80 V, 2h) along with a molecular weight marker in a 1.8% low melting agarose gel to confirm the size of the amplification products. Primers R1-SS-a and WQ-RP-b amplify a 100 bp cDNA sequence which encode a SS and an *EcoRI* restriction

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-51-

site. Primers PR-WQ-c and Stop-SalI-d amplify a 103 bp cDNA sequence which encodes a RP and stop codon and a SalI restriction site. Each PCR-amplified DNA fragment was excised from the low melt agarose gel and purified (QIAEX
5 for DNA Extractin from Agarose Gels. QIAGEN, Inc.).

SS-RP cDNA was generated using the PCR overlap extension technique. The first PCR-generated, purified cDNA SS and RP fragments (100 ng) were used in the second
10 PCR overlap extension reaction. Aliquots from two separate PCR reactions containing the overlapping fragments were mixed and subjected to PCR amplification using primers SS-R1-a and Stop-SalI-d. They amplify a 168 bp SS-RP cDNA sequence. The reaction was performed for 20 cycles in DNA
15 thermal cycler (conditions: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 45 s for each cycle). After amplification, 50 µl of each PCR reaction product was fractionated b electrophoresis (80 V, 2h) along with a molecular weight marker in a 1.8% low
20 melting agarose gel to confirm the size of the amplification products. The PCR-amplified DNA fragment was excised from the low melt agarose gel and purified (QIAEX for DNA Extraction from Agarose Gels. QIAGEN, Inc.) and used for subcloning.

25

B. *Subcloning of SS-RP cDNA into PCI Vectors.*

Twenty µg of PCR product (SS-RP) and the 3.7 Kb pCI vector (10 µg) were digested separately with EcoRI and SalI (1U/µg, 37°C, 3h). Then PCI vector was dephosphorylated
30 with calf intestinal alkaline phosphatase at 37°C for 30

-52-

min. The digested SS-RP product and the dephosphorylated pCI vector were fractionated by electrophoresis in 1.8% low melt agarose gel at 80V for 3h and excised from agarose gel, purified (QIAEX for DNA Extraction from Agarose Gels, QUAGEN, Inc.) and ligated (16°C, overnight, 1 Unit T4 DNA ligase, 3:1 molar ratio of fragment:vector DNA). 1µl of the ligation reaction was used to transform 20µl competent E. coli HB 101 cells. Transformed HB 101 cells were plated onto LB agar plates containing 100µg/ml ampicillin and incubated at 37°C for 16h. Bacterial colonies were randomly chosen from each plate, grown in culture (3ml LB broth, 100µg/ml ampicillin, 37°C overnight) and used for plasmid DNA isolation (QIAGEN, Inc.). The identity of the subcloned DNA was confirmed by digestion of the plasmid DNA (1µg) with EcoRI and SalI (10U/µg, 37°C, 2h) and two bands were identified. DNA sequencing was performed of the products to verify the insert SS-RP was correct sequencing.

6.2 Results: Construction of SS-RP cDNA and Subcloning Into Vector PCI.

SS and RP were synthesized by PCR and the products were of the correct predicted size by agarose gel electrophoresis using molecular weight markers (shown in Fig. 14). Following the second PCR amplification, the SS-RP product was made and the size of the product was confirmed by agarose gel electrophoresis (Fig. 15). The SS-RP cDNA fragment was digested with EcoRI and SalI and ligated into a pCI vector that had previously been digested with EcoRI and SalI and the ligated mixture was used to

-53-

transform E. coli stain HB 101. The size of the subcloned DNA was confirmed by plasmid DNA digestion with EcoRI and SalI (Fig. 16). The insert contained the correct sequencing as confirmed by direct sequencing (Fig. 17).

5 NIH 3T3 and TM4 cells are transfected with the SS-RP gene construct and cultured to produce the encoded recombinant SS-RP protein.

EXAMPLE 7

10 Transgenic Mammals

7.1. Transgenic mice with the GHRH-RP gene:

Using overlapping thermocycle amplification and fusion technology, the mouse GHRH signal sequence has been fused
15 onto the GHRH-RP portion of the GHRH gene (See generally Fig. 18). This fusion retains the protease cleavage site following the amino acids QR of the signal sequence allowing for protease cleavage to occur following the signal sequence and the GHRH-RP portion resulting in the RP
20 portion to be released from the signal sequence domain.

The sequence of the SS-RP fusion protein is

MLLWVLFVILILTSGSHCSLPPSPFFRMQR-

QEDSMWTEDKWMTLLESILQGFPRMKPSADA. This construction removes the GHRH portion from the configuration. The fused gene
25 was cloned into the EcoRI and SalI sites in the modified pCI vector from Promega. In the modified plasmid, pPGKCI, we have replaced the CMV promoter with the murine PGK promoter. The functional splicing signals and SV40 poly A sequences contained in the pCI plasmid are maintained.

30 The CMV promoter and enhancer have been replaced by mouse PGK which is expressed in all mice tissues. This construct

-54-

was sequenced to confirm correct DNA authenticity and the plasmid used in transient transfection assays to determine the expression of the "fused" SS-RP construct. Plasmid DNA is injected into pronuclei of C3H/HeJ mice as previously
5 described. Transgenic mice derived from these injections are first analyzed for the presence and expression of the transgene by Southern blots of tail DNA and RNA analysis of a wide variety of tissues. The transgenic mice protocol utilizes standard pronuclear-injection derived transgenic
10 mice.

7.2 Knock-out of the GHRH-RP domain of the GHRH gene:

Two different gene disruption strategies are employed,
15 as generally described in Bronson, S.K. and Smithies, O., "Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells", *J. Biol. Chem.* 269: 27155-27158 (1994). The first involves a direct gene replacement with three stop codons inserted immediately following the GHRH domain of
20 the amino terminal portion of sites in the GHRH gene such that the expression of the GHRH gene will be terminated immediately following the GHRH domain of this gene and elimination of the GHRH-RP peptide will be accomplished. This involves one distinct homologous recombination step in
25 ES cells. The gene is disrupted using a targeting vector consisting of 5' and 3' flanking regions of the GHRH gene encompassing genomic domains upstream and downstream of the RP region. The neomycin (neo) gene will be included in this configuration such that it is inserted downstream of
30 the last exon (exon 5) and should not cause any deleterious effect on the GHRH gene expression. After transfection,

-55-

cells that have undergone recombination are selected for resistance to G418. Usually the selected cells are not homozygous so analysis of the resulting chimeric mice are not as informative. Therefore, homozygous ES cells with
5 the gene altered will be selected for in one of two ways, either a hygromycin vector, constructed in exactly the same manner as the neo resistant construct is used to disrupt the second allele, or ES cells are selected using increasing concentrations of G418 usually resulting in
10 clones that have two copies of the neo gene due to the mutation becoming homozygous.

The second technique involves the use of the loxP-cre system, such that loxP sites are inserted at the 5' and 3'
15 ends of the replacement fragment and encompassing the fifth exon such that when combined with the recombinase cre, through matings with mice that contain the cre recombinase, the region between the loxP sites is recombined out of the genomic DNA and a single loxP site remains. This results,
20 in this particular instance, in the deletion of most of the RP region and a non-functional RP peptide that maintains the protease cleavage site between the GHRH and GHRH-RP domain allowing for the short, non-functional RP protein to be processed from the total precursor protein. The
25 advantage of this second procedure results in the advantage of removing the neo gene from the mice, in vivo, but, more importantly, the ability to mate the mice containing the loxP construct with mice containing the cre recombinase. This latter fact is advantageous as a large number of mice
30 strains have been and are being created with the cre recombinase expressed in a tissue specific manner, allowing

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

-56-

for the disruption of the RP protein to be accomplished in designated tissues only (Jackson Labs).

Alternatively, other constructs will be, or could be
5 created that perform the same function, i.e., disruption of the carboxy terminal region of the GHRH gene such that the GHRH-RP portion of this gene is not expressed resulting in a "knock-out" or complete loss of the production of a functional GHRH-RP peptide, but maintaining the amino
10 terminal portion of the gene, namely the GHRH peptide and associated signal sequence for protein processing.

Several clones with homologous recombination are then used in standard blastocyst injection to create the mice
15 which are maintained and analyzed in standard fashion.

Injectons for both knock-out and transgenic mice are accomplished as generally described in Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Brigid Hogan, et al.,
20 Cold Spring Harbor Laboratory (1986).

All references cited herein are indicative of the skills possessed by one ordinarily skilled in the art, and all such references are hereby incorporated herein by
25 reference as if each had been individually incorporated by reference and fully set forth.

-57-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for stimulating the production of stem cell factor by Sertoli cells, comprising contacting the
5 cells with an effective amount of GHRH-RP.

2. The method of claim 1, wherein the GHRH-RP is selected from:

10 (a) a polypeptide having the sequence of a native GHRH-RP polypeptide; and

(b) a polypeptide which is at least 80% similar to a polypeptide of (a) and which stimulates the production of
15 stem cell factor in Sertoli cells.

3. The method of claim 2 wherein the GHRH-RP is human GHRH-RP.

20 4. The method of claim 2 wherein the GHRH-RP is rat GHRH-RP.

5. A method for stimulating spermatogenesis in a mammal in need thereof, comprising contacting Sertoli cells
25 of the mammal with a therapeutic amount of GHRH-RP.

6. The method of claim 5, wherein the GHRH-RP is selected from:

30 (a) a polypeptide having the sequence of a native GHRH-RP; and

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(b) a polypeptide which is at least 80% similar to a polypeptide of (a) and which stimulates the production of stem cell factor in Sertoli cells.

5

7. The method of claim 6 wherein the GHRH-RP is human GHRH-RP.

8. The method of claim 6 wherein the GHRH-RP is rat
10 GHRH-RP.

15

9. A method for inhibiting spermatogenesis in a mammal, comprising decreasing the intratesticular GHRH-RP activity of the mammal.

10. The method of claim 9 which includes administering antibodies to GHRH-RP to the mammal.

11. A transgenic, non-human mammal essentially all
20 cells of which lack expression of GHRH-RP.

12. The transgenic non-human mammal of claim 11, which is a mouse.

25 13. A transgenic mammal, essentially all cells of which include introduced DNA encoding a GHRH-RP polypeptide.

14. The transgenic mammal of claim 13, which is a
30 mouse.

-59-

15. A pharmaceutical composition for promoting spermatogenesis in a mammal, comprising GHRH-RP in a pharmaceutically-acceptable carrier.

5 16. An isolated polynucleotide encoding a GHRH-RP polypeptide, the polynucleotide being free from a sequence encoding a GHRH polypeptide.

17. A method for producing GHRH-RP, comprising
10 culturing a host cell containing introduced DNA encoding a GHRH-RP polypeptide to produce GHRH-RP.

18. The method of claim 17, wherein the introduced DNA is free from sequences encoding GHRH.
15

19. A host cell containing introduced DNA encoding a GHRH-RP polypeptide, the DNA being free from sequences encoding GHRH.

20 20. A vector including DNA encoding GHRH-RP, the DNA being free from sequences encoding GHRH.

1 / 15

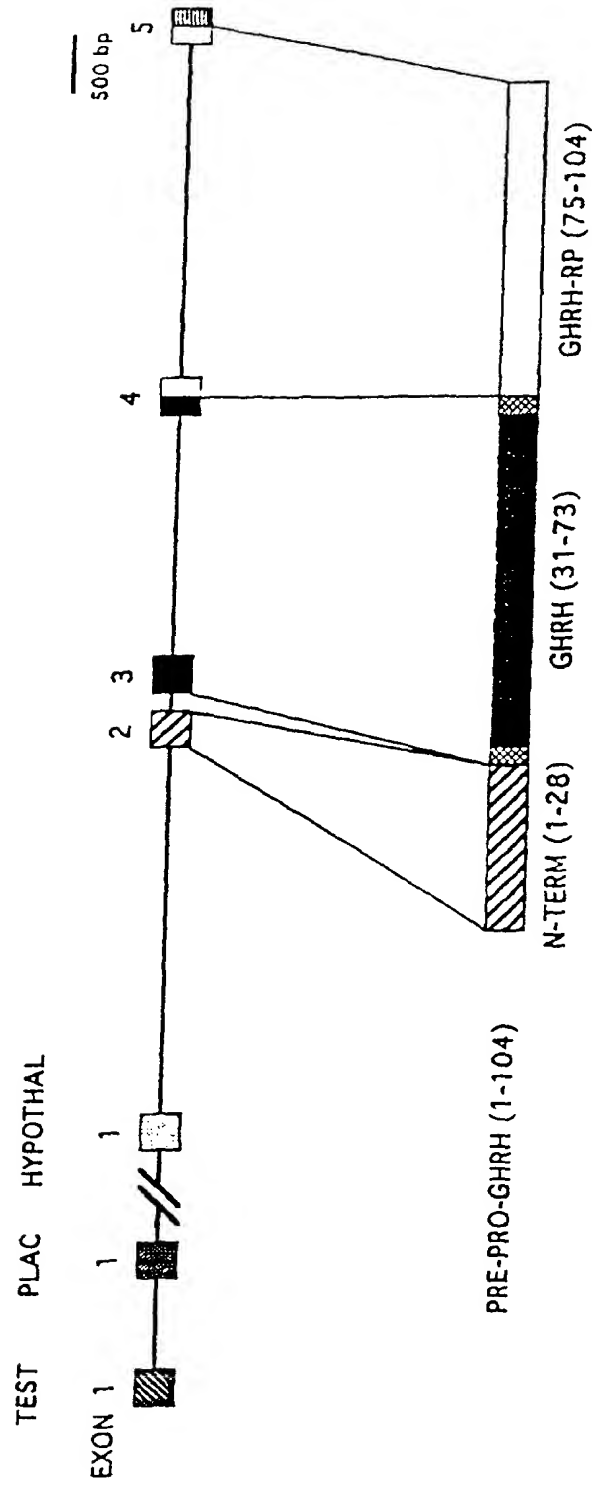
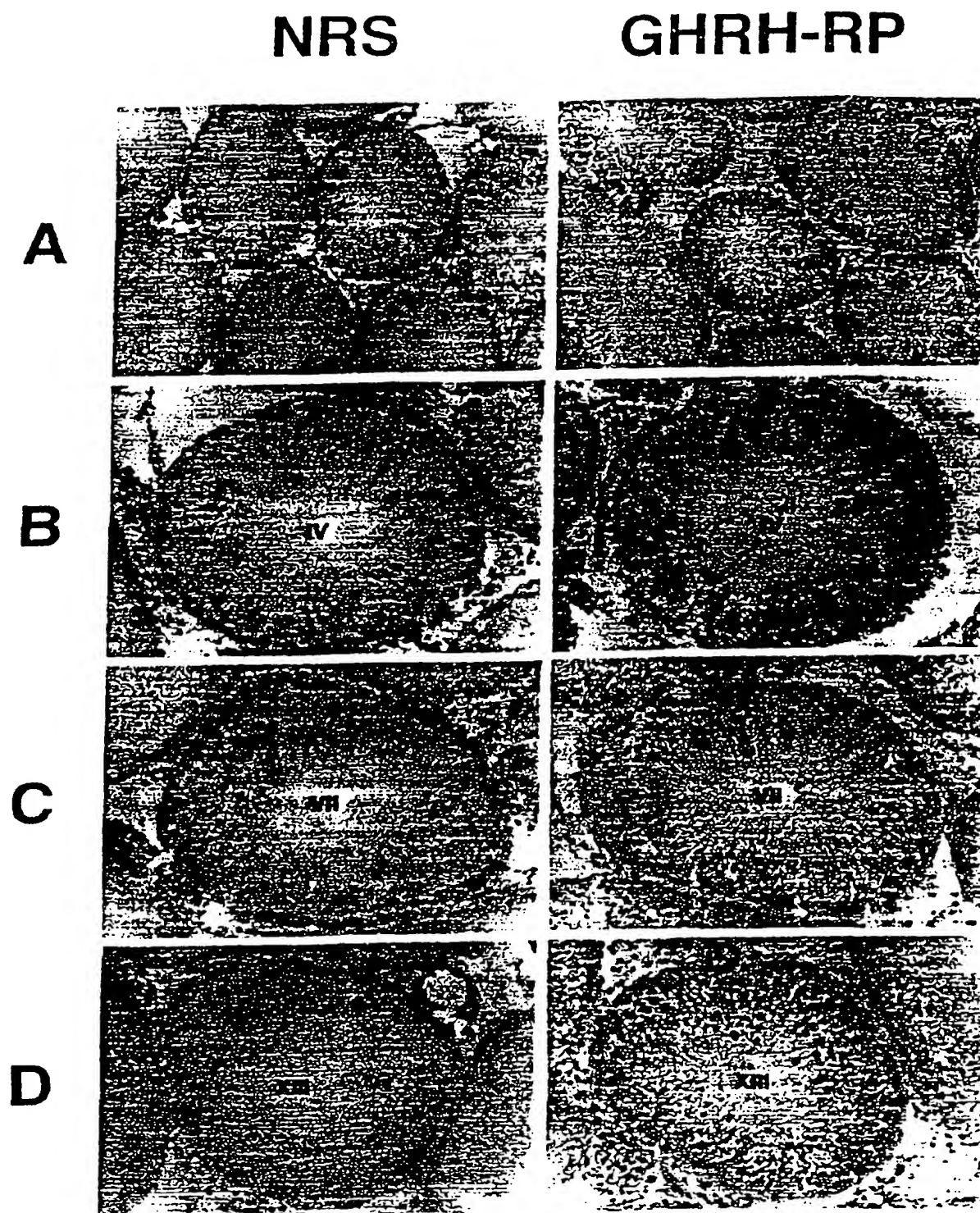


FIGURE 1

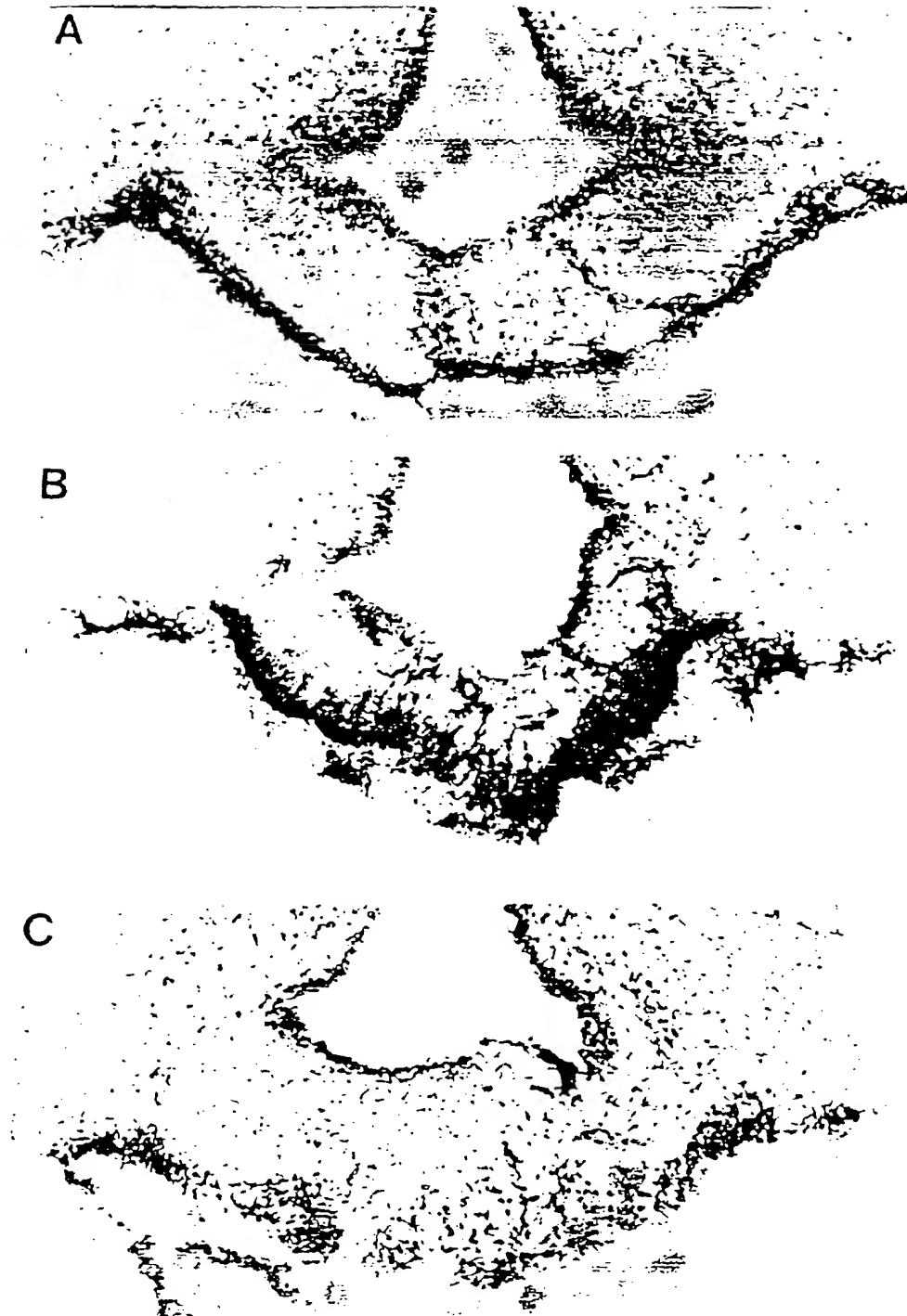
2 / 15

FIGURE 2



3/ 15

FIGURE 3



4 / 15

FIGURE 4

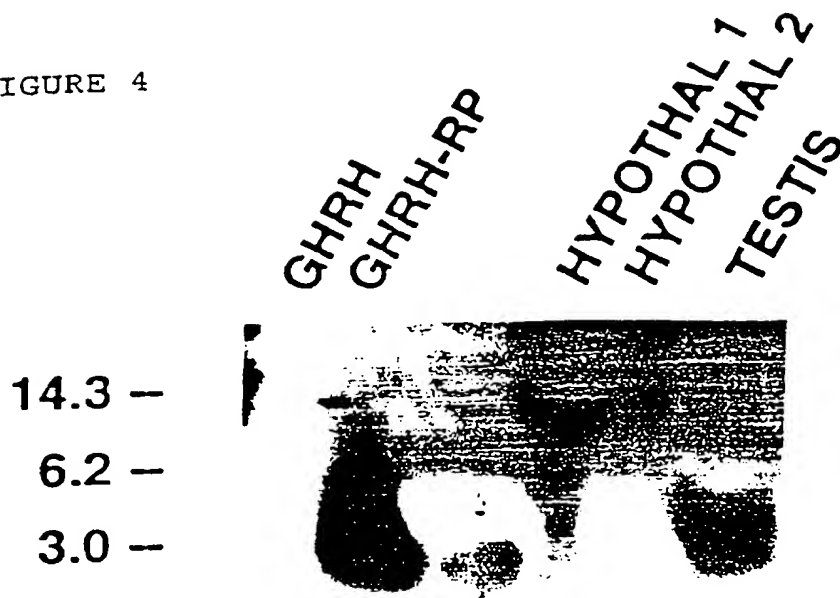
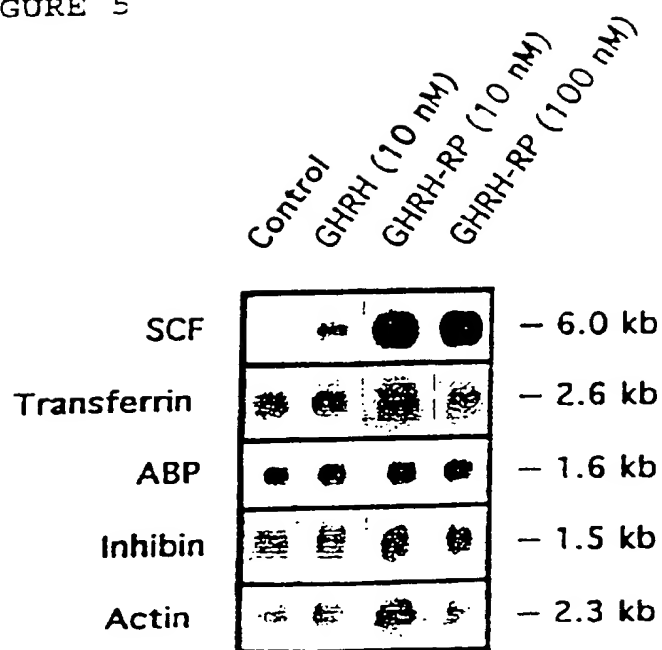
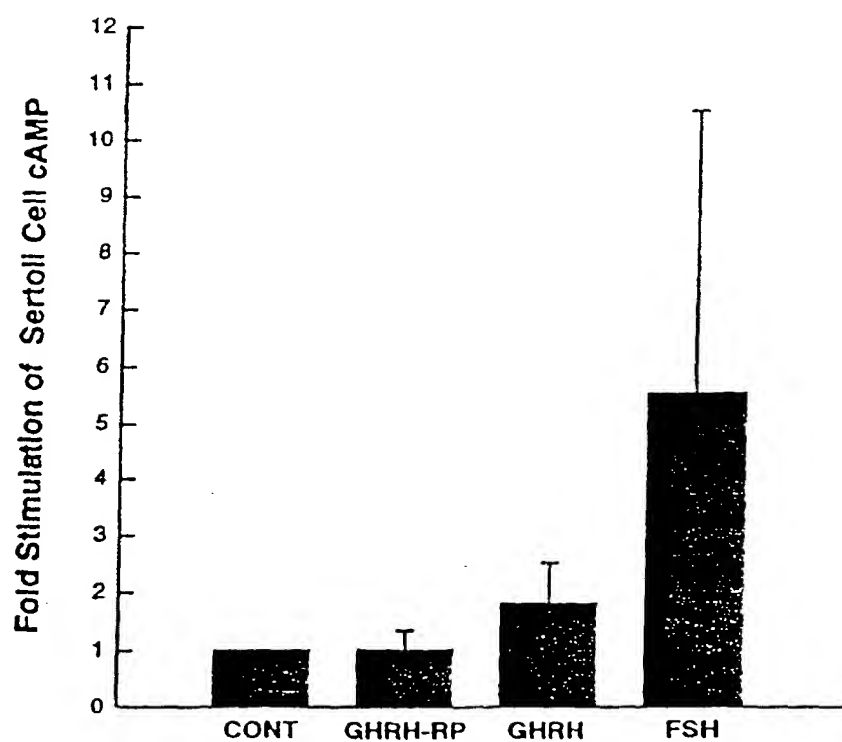


FIGURE 5



5/15

FIGURE 6



A Testicular GHRH transcript

-TESTIS EXON 1*		
1	CTGGGATGCCACGGAAATCGACGCAATTCGACGAAACACGCTCTGAACCCOCAGGAGCT	60
	EXON 2	
61	GCACACCACTCTATTAGGTGCGGCCAGGAGTGAAGGATGCCACTCTGGGTGTTCTTTGT	120
	MetProLeuTrpValPhePheVa	
121	GCTOCTCAOCTCACCAGTGGCTGCCACTOCTCACTGCCCCOCTCACTOCTCAGGCT	180
	ILeuLeuThrLeuThrSerGlySerHisCysSerLeuProProSerProProPheArgVa	
	EXON 3	
181	GGGGGGCATCGACAGGOCATCTTCACGAGGCTACGGAGAACTCGGGCAATTATA	240
	lArgArgHisAlaAspAlaIlePheThrSerSerTyrArgArgIleLeuGlyGlnLeuTy	
	EXON 4	
241	TGCGCGCAAATCTGTCGCAAAATCATGAACAGGCAGCAAGGGGAGAGGAACACGGAACA	300
	rAlaArgLysLeuLeuHisGluIleMetAsnArgGlnGlnGlyGluArgAsnGlnGluG	
301	AAGATCGACGTTCAACCCOCTATTGGACAGACTGTGGGACAGGACAAGCAGATGGGCT	360
	nArgSerArgPheAsnArgHisLeuAspArgValTrpAlaGluAspLysGlnMetAlaLe	
	EXON 5	
361	GGAGAGCATCTTCCAGGATTCCCAAGGATGAAGCTTTCAGCGGAGGCTTGAAGCTCGG	420
	uGluSerIleLeuGlnGlyPheProArgMetLysLeuSerAlaGluAlaEnd	
421	CCCCAAACATAGCTGGACGCTGTTACTTCTACTTCACTTCTGATCTTCTOCTTCTCTG	480
481	TGAATACAATAAAGACCCAGTTCTCATCTGCAAAAAAAAAAAAAA	526

B. Alternate transcript 1

```

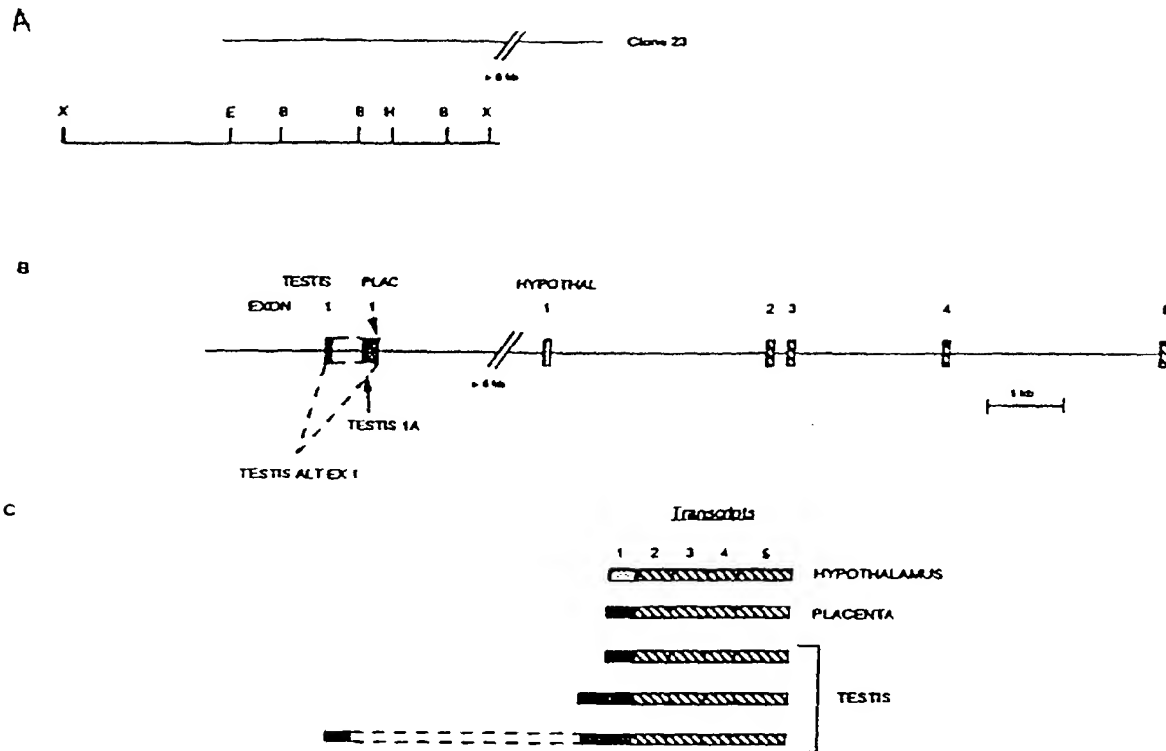
      -TESTIS EXON 1*
1   CTGGGGATGCCACGGAAACATGGAGCCAAATCCACAGGAACACGCTCTGAACCCCAAGGAGCT 60
      |
61   GCACACCACTCTATTAGGCTCAGGACGGAGGAAGGCGCTCTCTGCTCTGCCAGCCTTAA 120
      -TESTIS EXON 1A*
121  GATGGGAATTTTAGGGTCTGGACATCACTGGTCTCCAGGTCAAGCTTTCTCTGGTTGCAGA 180
      | EXON 2
181  TCTCTCTCTGGTCAAAGCTCCAGCTCTGGCTGGATCCCAAACTGCACAGTGTCCCGGCCA 240
      |
241  GGAGTGAAGGATG..... 253

```

C. Alternate transcript 2.

- TESTIS ALTERNATE EXON 1 *

1	CTCGGGATGCCACGGCAACATCGAGCCAAATCGCAAGAACACCGCTCTGAACCCGAGGAAGCT	60
61	CCACAGCACTCTATTAGGTAGTTTATTGGCGGCATCAAACTCGGAGTCTACCTCCCTCGGT	120
121	TCACAAATCAGTTTCAGAGAGAGGATCAAACTTCCCAAGATTAAAGAGTAAATGGTGTAC	180
181	CTGCTCTCTCTCCCTGAATGCGATGATGCCAGGATGTGACTGGTGACCTGAAAGGGAGG	240
241	GAAATCAAGGACAGGAACGGCTGGGTGTGATGAGACCTCAAGGCTGTTGTGAGCCCCCA	300
301	AGAACAGACTCTCTGGAGGCGAGGCTTTATCGAGCAAGTCTGTTCAACTGGGGAGCACAAAG	360
361	GCTACTTAAATTTTTTGGGAGTGAGTAGGGGCACTCAGGGCAACCGATGTCATTGTGCA	420
421	AGACCAAGGTGTAGGGAATCCTTTACTGCATGAAAAGGAATTTGAGGTGCTTCTCTCTG	480
481	GACGTGACTTTGTGCAGAGAGGAAATTTAACTTATAACCTGGCCACGGTTATGACTACC	540
541	TCAGGATTTCAGAGCTGGGGCCAAAGGCTATGTAGCTGCTCTGGACATGCAAGGCTCA	600
601	GGACGGAGAAAGGAGGCTCTCTCTCTCCAGCTTTAAGATGGGAATTTTAGGGTCTGGA	660
661	CATCAGCTGGTGTCTCAGGTCACTCTCTCTGGTTCAGATCTCTCTCTCTAAGCTTCCA	720
1 EXON 2		
721	CTCTGCTGGATGCCACAACTGACAGCTGCTCCGCGCCAGGAGTGAAGGATG.....	771

7/15
FIGURE 8

8

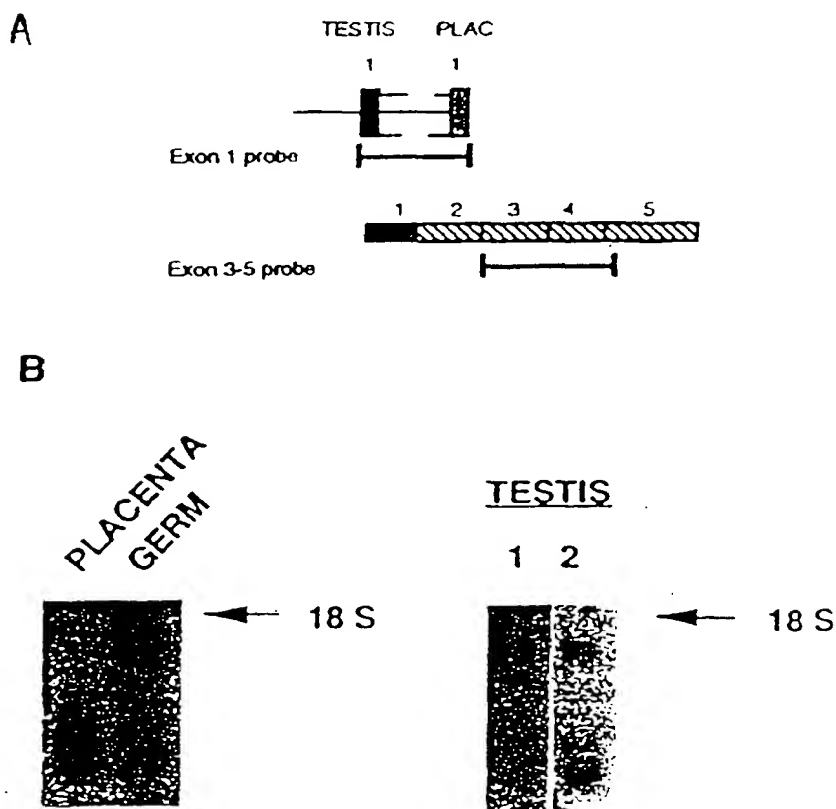
8 / 15

```

-660  GAACTGCTTCTCTGATGAGGACTGCATGAGCAGAGACCTGCTGATGGAGGCCACTAAG  -601
-600  GCTTGGGGAGGAGCTAGAAGTAGAAGCAGGAACCACTGGAGCTGACTCTCTCTCTCA  -541
-540  GATGCCACAGGCTGTCAGAAAGGGGACTGGGAAAGGGCTTCTCTTCTGCTCCAGACA  -481
-480  GAGTCTGTTTTGTTTCTGGCTACTCTGCTGCTGGCTCTCTCCAAACACAGTTCTTAAAGC  -421
-420  TCTGGACATACACAATTCCACAGGCCCTCTCTCCAGGATCCAGAAACAGGACAGTCACAT  -361
-360  CCGGCATCTCTGCCAAACCCCGCTCTCTCAGCTTCAATGGCAGTCTCAGTCCCTGGCA  -301
-300  CCACCCACCGAATCCCTTCCCTGCCACCTGTGTGGAAGCGGGATACTGGACAGTCATT  -241
-240  TTAGCTGATTTGTTCAATTGTTTCTGAGCTTTGGCAAGCCACTCCATCTGTAGATGG  -181
-180  CTGTAAAGCAACTTCCAAAGCAGCATGCTTCTTAGCCACTTCCAGGAAGCTTCCCAAGGGC  -121
-120  TCCCTTTTCAATCTCTCTTCCAGGGTCTGTAGAATACAGCCCTGGATGTTTCCAAAGCACG  -61
-60  GACTGGCATAAATAAGGCCAGGGCTCTCCATGACACCGTTCAATTGAGCTTATTGAGGGTT  -1
0  CTGCGGATGCCACGGAAACATCGAGCCAAATCCCAAGAACAGGCTCTGAACCCCAAGGAGCT  59
60  GCACACCACTCTATTAG  76

```

FIGURE 10



9/ 15

FIGURE 11

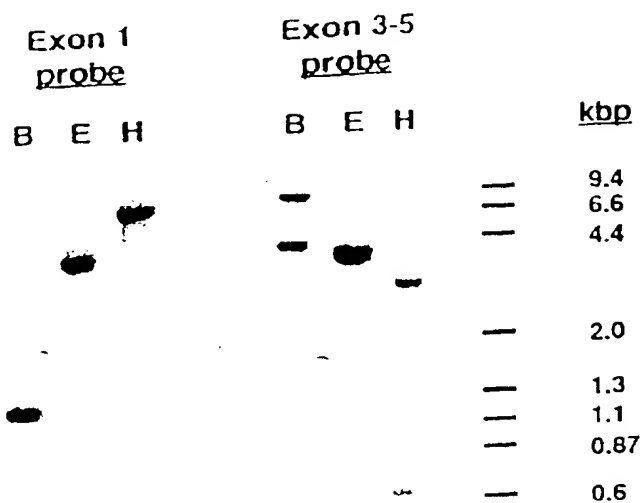
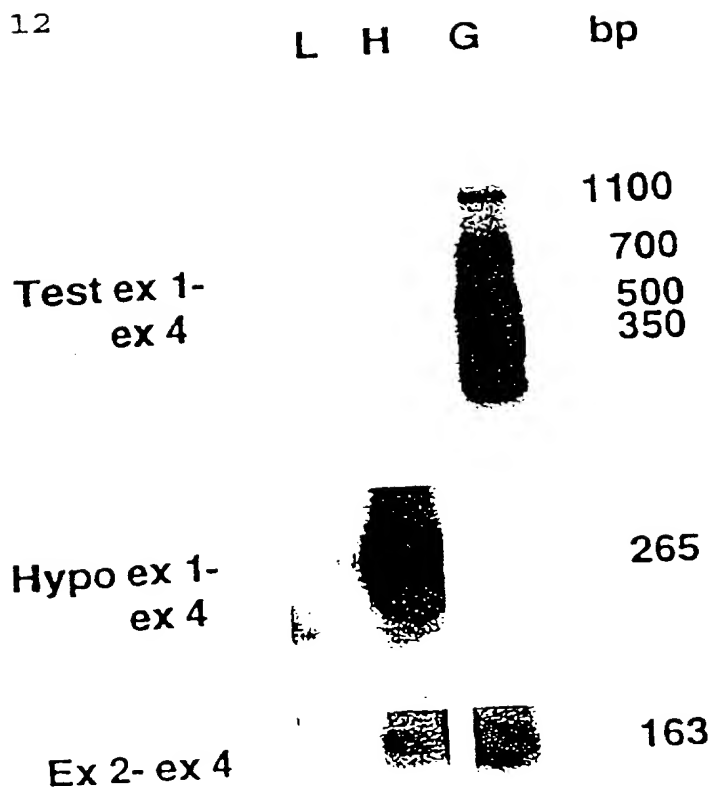
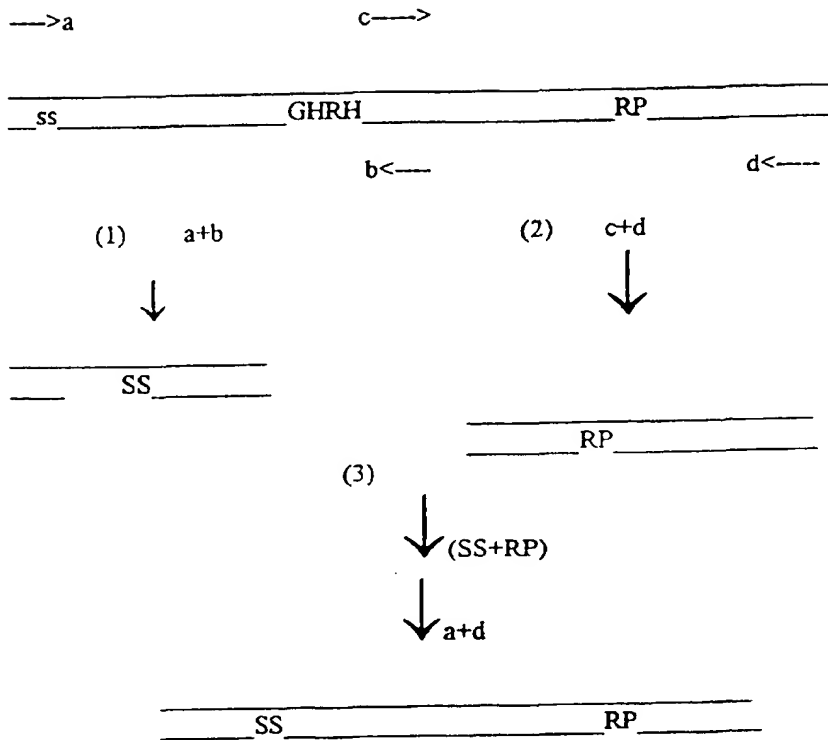


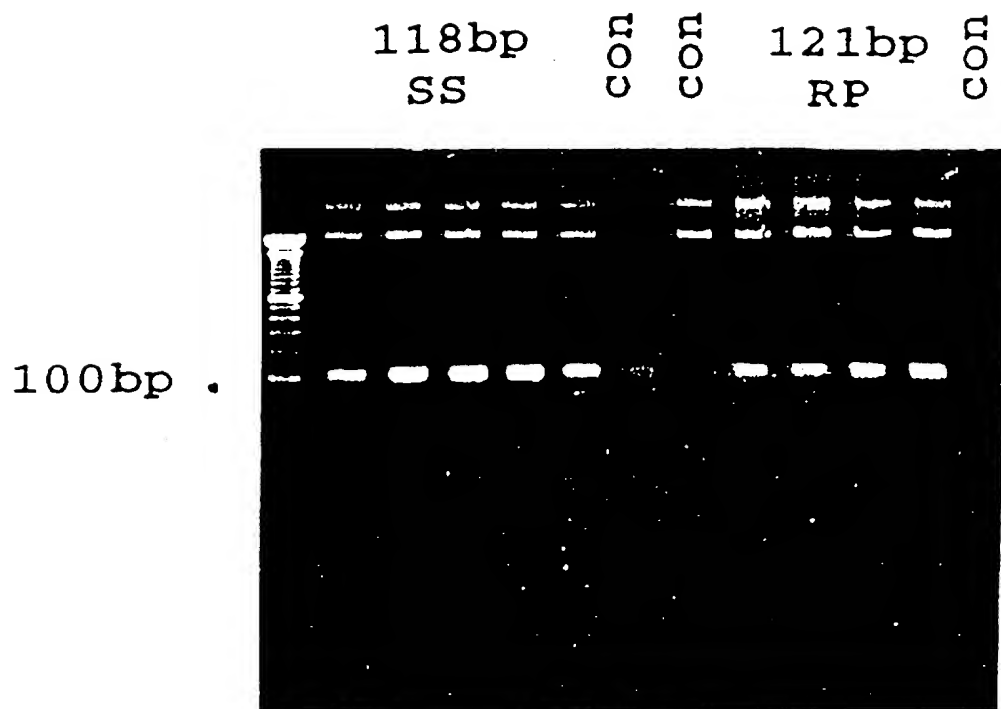
FIGURE 12



10 / 15
FIGURE 13

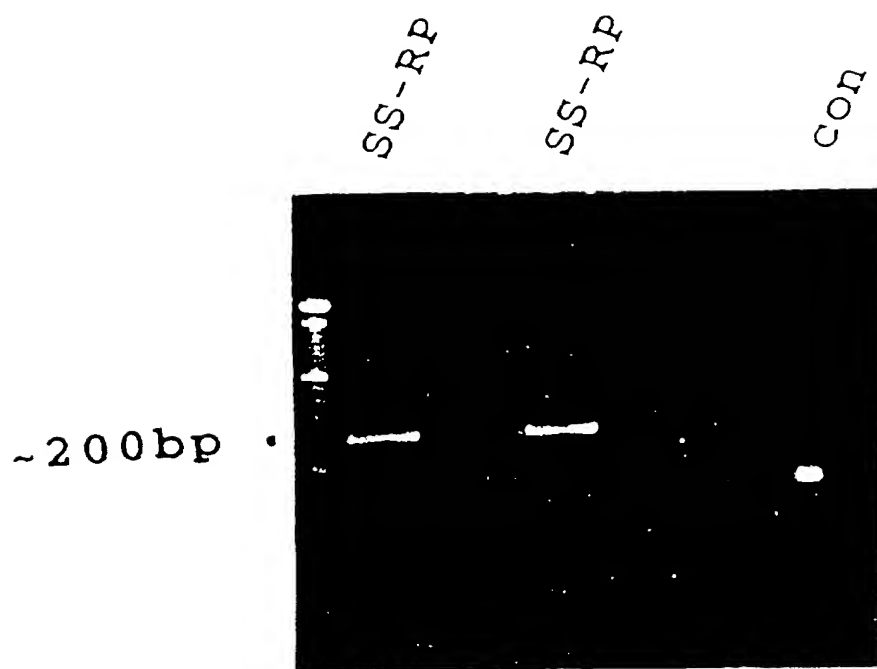
11 / 15

FIGURE 14



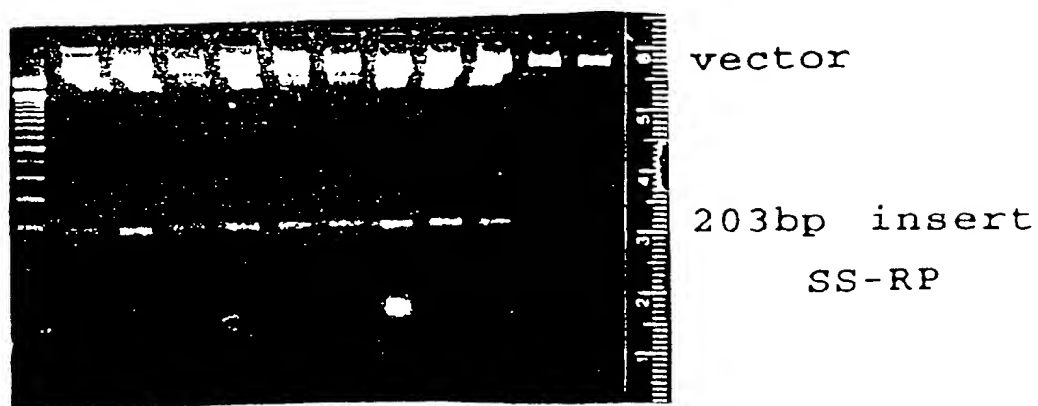
12 / 15

FIGURE 15



13/ 15

FIGURE 16



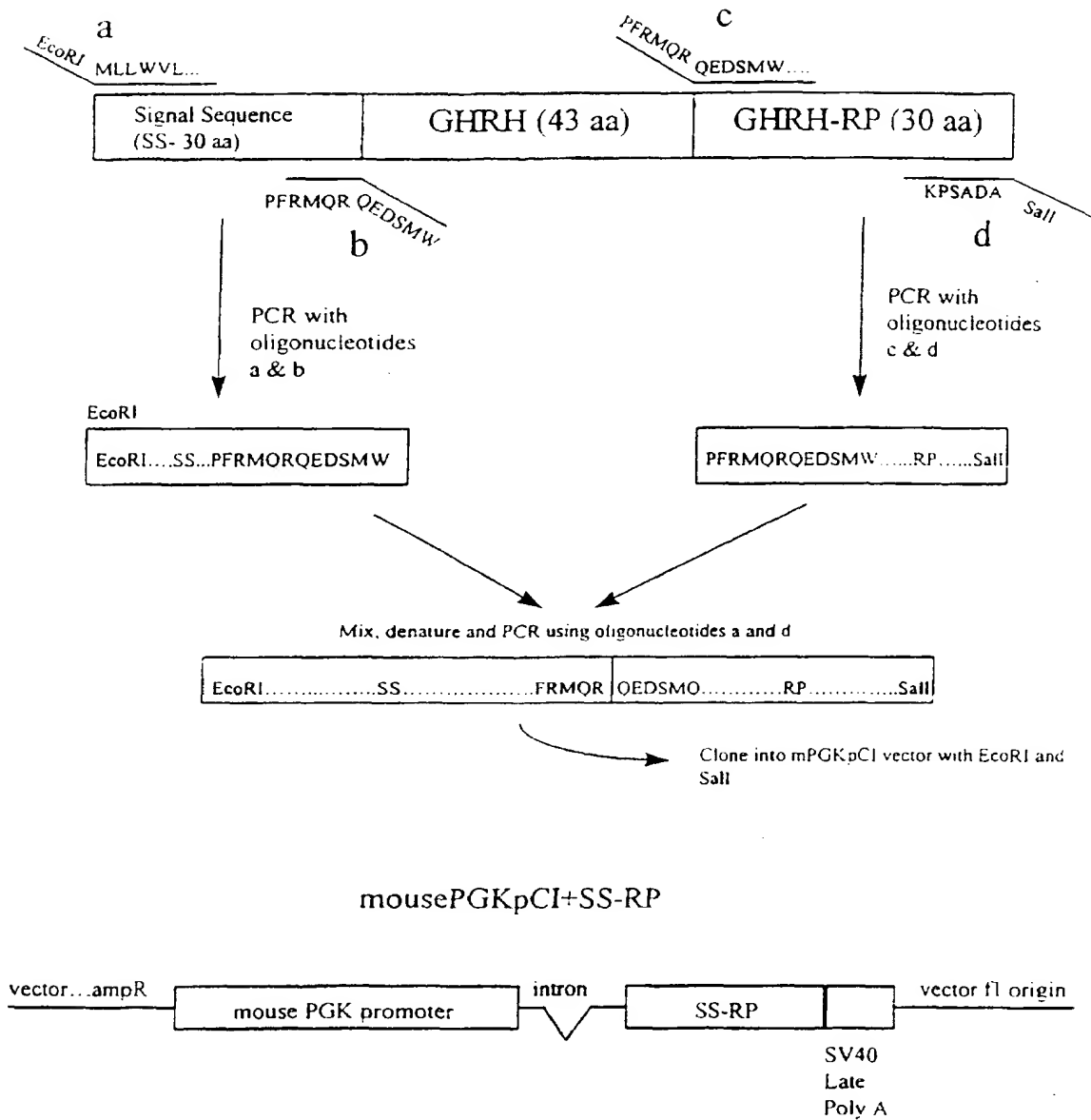
14 / 15

FIGURE 17

5'→AGCCTCGAGAATTCATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTGATCCTCATCCTCACCAGTGGCTC
CCACTGCTCATCACTGCCCCCTCACCTCCCTTCAGGATGCAGCGACAGGAAGACAGCATGTG
GACAGAGGACAAGCAGATGACCCTGGAGAGCATCTTGCAGGGATTCCCAAGGATGAAGCCTT
CAGCGGACGCTTGAGTCGACCCGG→3'

15 / 15

FIGURE 18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/20622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : Please See Extra Sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERRY, S. et al. Identification of a Rat GHRH-Like Substance and its Messenger RNA in Rat Testis. Endocrinology. 1988, Vol. 123, No. 1, pages 661-663, especially 662 and 663.	1-20
Y	BLOCH, B. et al. Immunohistochemical Evidence that Growth Hormone Releasing Factor (GRF) Neurons Contain an Amidated Peptide Derived from Cleavage of the Carboxyl-Terminal End of the GRF Precursor. Endocrinology. 1986, Vol. 118, No. 1, pages 156-162, especially pages 157 and 161.	1-20
Y	BRAR, A. K. et al. Biosynthesis of Human Growth Hormone-Releasing Hormone (hGRH) in the Pituitary of hGRH Transgenic Mice. Endocrinology. 1991, Vol. 129, No. 6, pages 3274-3280, especially, pages 3276-3280.	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* ¹ Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* ^A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* ^X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* ^E earlier document published on or after the international filing date	* ^Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* ^L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* ^Z document member of the same patent family
* ^O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
* ^P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

28 MARCH 1997

Date of mailing of the international search report

18 APR 1997

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

SALLY P. TENG

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/20622

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSSI, P. et al. Follicle-Stimulating Hormone Induction of Steel Factor (SLF) mRNA in Mouse Sertoli Cells and Stimulation of DNA Synthesis in Spermatogonia by Soluble SLF. Developmental Biology. 1993, Vol. 155, pages 68-74, especially pages 70-72.	1-20
Y	SCRIVASTAVA, C.H. et al. A New Target for Growth Hormone Releasing-Hormone Action in Rat: The Sertoli Cell. Endocrinology. 1993, Vol. 133, No. 3, pages 1478-1481, especially pages 1479-1480.	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/20622

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/20622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: IPC (6):

C07K 14/60, 16/22; C12N 15/18, 15/63, 15/70, 15/74, 15/79; C12Q 1/00; A61K 38/17

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US CL :

536/23.5; 530/387.1, 399; 514/2; 435/7.2, 69.1, 252.3, 254.11, 320.1, 325

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched
Classification System: U.S.

536/23.5; 530/387.1, 399; 514/2; 435/7.2, 69.1, 252.3, 254.11, 320.1, 325

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, Biosis, Medline, WPI, Dialog

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claims 1-8 and 15-20, drawn to GHRH-RP, its encoding nucleic acid, method of making GHRH-RP, and method of using GHRH-RP to stimulate the production of stem cell factor.

Group II, claims 9 and 10, drawn to a method of decreasing GHRH-RP activity.

Group III, claims 11 and 12, drawn to transgenic non-human mammal that do not express GHRH-RP.

Group IV, claims 13 and 14, drawn to transgenic mammal that expresses GHRH-RP.

and it considers that the International Application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group I is the GHRH-RP polypeptide. The special technical feature of Group II is a compound that decreases the activity of GHRH-RP. The special technical feature of Group III is a transgenic non-human mammal that does not express GHRH-RP, and the special technical feature of Group IV is a transgenic mammal that expresses GHRH-RP. The special technical feature of each group is not the same as or does not correspond to the special technical feature of any other group because the products of Groups I, III, and IV are structurally and functionally distinct and the methods of Groups I and II use different reagents and method steps to accomplish different goals. The GHRH-RP polypeptide of Group I, the transgenic mammal that does not express GHRH-RP, and the transgenic mammal that expresses GHRH-RP are characterized by different structural and functional properties. The method of Group II does not require the product of Groups I, III, or IV, and the method of Group I does not require the product of Groups III or IV. Accordingly, the Groups are not linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept.